

Mevlida Kararić

Nopean autovasta-ainemäärityksen optimointi diabetes autovasta-ainepositiivisten elinluovut- tajien tunnistamiseksi

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Sosiaali- ja terveysala (YAMK)
Klininen asiantuntija
Opinnäytetyö
Päivämäärä 19.11.2014

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Mevlida Kararić Nopean autovasta-ainemäärityksen optimointi diabetes- autovasta-ainepositiivisten elinluovuttajien tunnistamiseksi 49 sivua + 12 liitettä 19.11.014
Tutkinto	Ylempi ammattikorkeakoulututkinto
Koulutusohjelma	Terveys- ja hoitoala
Suuntautumisvaihtoehto	Kliininen asiantuntija
Ohjaaja(t)	Yliopettaja Riitta Lumme FT Tutkija Taina Härkönen
<p>Tyypin 1 diabetes (T1D) on autoimmuunisairaus, jossa haiman insuliinia tuottavien beeta-solujen tuhoutumisen myötä verenkiertoon ilmestyy autovasta-aineita haiman beeta-solujen eri proteiineja vastaan. Näistä merkittävimpiä ovat autovasta-aineet insuliinia- (IAA), glutamiinihappodekarboksylaasia- (GADA), saarekesoluantigeenia- 2- (IA-2A) ja sinkin kuljetusmolekyyliä 8 (ZnT8A) vastaan.</p> <p>Työn tarkoituksena oli kehittää ja optimoida nopea määritysmenetelmä GADA-, IA-2A- ja ZnT8A vasteiden määrittämiseksi, jolloin saisimme lyhyemmässä ajassa tietoa, onko elinluovuttajien seerumissa diabetekseen liittyviä autovasta-aineita. Tavoitteena oli saada kaikki kolme autovasta-ainetta analysoiduksi noin kahdessa tunnissa siten, että tieto elinluovuttajan T1D autovasta-aineista on selvillä haiman saapuessa Uppsalan yliopiston saarekelaboratorioon noin klo 9:00 aamulla Suomen aikaa. Näin saisimme elinluovuttajan haiman tarkoituksenmukaiseen jatkokäsittelyyn.</p> <p>Tutkimus suoritettiin Helsingin yliopiston Lastenklinikan tieteellisessä laboratoriossa. Näyteaineistona olivat Lasten diabetesrekisterin seeruminäytteet. Käytössä olevaa radioimmunologista menetelmää (RBA) optimoitiin mm nostamalla inkubaatiolämpötilaa 4°C:sta huoneenlämpöön ja lyhentämällä yli yön inkubaatiota 40 minuutiksi. ELISA tehtiin ensin valmistajan (RSR) ohjeiden mukaisesti, sitten menetelmää muokattiin mm. lyhentämällä inkubaatioaikoja 20 minuutiksi ja nostamalla inkubaatiolämpötilaa.</p> <p>Tulokset osoittivat nopean ja standardi RBA- menetelmän tuloksien vastaavan toisiaan. Ainoastaan positiivisuuden rajalla olevilla arvoilla oli vaihtelua positiivisuuden suhteen. ELISA tulokset olivat yhdenmukaisia keskenään ja RBA:n kanssa. Tulokset osoittavat, että kaikki kolme T1D autovasta-ainetta pystytään analysoimaan noin kahdessa tunnissa sekä RBA- että ELISA menetelmillä ja tulokset korreloivat hyvin standardimenetelmillä saatuihin tuloksiin ja soveltuvat täten elinluovuttajien T1D autovasta-aineiden nopeaan analysointiin.</p>	
Avainsanat	Tyypin 1 diabetes, autoimmuunitauti, autovasta-aine, ELISA, RBA

Author(s) Title Number of Pages Date	Mevlida Kararić Rapid assays for detection of type1 diabetes-associated auto-antibodies in organ donors 49 pages + 12 appendices 19 November 2014
Degree	Master of Healthcare
Degree Programme	Master's Degree Programme in Clinical Expertise
Specialisation option	Clinical Expertise
Instructor(s)	Riitta Lumme, Principal Lecturer Taina Härkönen, PhD
<p>Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease arising from the destruction of the insulin-producing beta-cells in the pancreatic islets. The appearance of islet cell specific auto-antibodies towards beta cell antigens such as glutamic acid decarboxylase (GADA), insulin (IAA), insulinoma-associated antigen-2 (IA-2) and zinc transporter-8 (ZnT8A) are the first detectable markers of the destructive process.</p> <p>The current study set out to develop rapid assays for autoantibodies to GADA, IA-2A and ZnT8A by modifications of both our standard radiobinding assay (RBA) and a commercial ELISA. Our preliminary aim was to get all three autoantibody results within 2 hours, i.e. before the processing of the organ donors' pancreata in the islet isolation laboratory, Uppsala University. Various histological samples and RNA are taken from the pancreas of autoantibody-positive subjects in order to understand the mechanisms of beta-cell destruction.</p> <p>The study was performed in the Scientific Laboratory, Children's Hospital, University of Helsinki. Serum samples were from the National Pediatric Diabetes Register. The RBA was modified into a rapid assay by incubating the labeled antigens and serum for 40 minutes at RT instead of overnight at 4 °C. Immune complexes were bound to Protein-A Sepharose at RT for 20 minutes. Further, antigen labels were made ready, standards and controls were pipetted on plates on beforehand and all were kept at -80 °C. The RSR ELISAs were first performed according to the manufacturer's instructions. Then assays were modified by shortening the incubation times to 20 minutes and all incubations performed at RT.</p> <p>The results showed a strong consistence for medium titers and negative responses, but RBA results close to cut-off values showed some discrepancies. ELISA results were more consistent. Our results indicate that all three (IA-2A, GADA and ZnT8A) RSR ELISA assays can be accomplished within 2 hours and the results correlate well with results obtained according to the manufacture's instructions. All three RBA assays can be performed in about 2 hours and the results correlate well with conventional assays and are in good concordance with the ELISA results.</p> <p>We can exploit rapid assays for detection of type1 diabetes-associated autoantibodies in organ donors.</p>	
Keywords	Type 1 diabetes, autoimmune disease, autoantibodies, RBA, ELISA

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Diabeteksen kehittyminen ja luokittelu	2
2.1	T- ja B-solujen osuus tyypin 1 diabeteksessa	3
2.2	Perintö- ja ympäristötekijöiden osuus tyypin 1 diabeteksessa	4
2.2.1	Perintötekijät	4
2.2.2	Ympäristötekijät	5
3	Haiman- ja saarekesolusiirrot	7
4	Autovasta-aineet	8
4.1	Tyypin 1 diabeteksen autovasta-aineet	9
4.1.1	Saarekesoluvasta-aineet (ICA)	9
4.1.2	Insuliiniautovasta-aineet (IAA)	10
4.1.3	Glutamaattidekarboksylaasi autovasta-aineet (GADA)	10
4.1.4	Saarekesoluantigeeni-2-autovasta-aineet(IA-2A)	11
4.1.5	Sinkin kuljetusmolekyyli-8-autovasta-aineet (ZnT8A)	11
5	Autovasta-aineiden määrittäminen	12
5.1	Radioimmunologinen määrittäminen (Radiobinding Assay, RBA)	12
5.1	Entsyymi-immunologinen määrittäminen (ELISA)	14
6	Työn tarkoitus, tavoite ja tutkimusongelmat	15
7	Toimintaympäristö ja näyteaineistot	16
7.1	Lasten diabetesrekisterin näyteaineisto	17
7.2	Elinluovuttajien näyteaineisto	17
8	Toteutus	17
8.1	Radioimmunologisen määrittäksen optimointi	19
8.1.2	Standardi GADA	21
8.1.3	GADA-pikamenetelmä	21
8.1.4	Standardi IA-2A	22
8.1.5	IA-2A-pikamenetelmä	22
8.1.6	Standardi ZnT8A	23
8.1.7	ZnT8A-pikamenetelmä	23
8.1.8	GADA, IA-2A ja ZnT8A-määrittäminen yhtäaikaaisesti pika RBA:lla	23

8.2 Elisa määrittelyn optimointi	24
8.2.1 ELISA GADA-määrittely	27
8.2.2 ELISA GADA-pikamäärittely	27
8.2.3 ELISA IA-2A-määrittely	27
8.2.4 ELISA IA-2A-pikamäärittely	28
8.2.5 ELISA ZnT8A-määrittely	28
8.2.6 ELISA ZnT8A-pikamäärittely	28
8.2.7 GADA-, IA-2A- ja ZnT8A-määrittely yhtäaikaaisesti pika ELISA:lla	28
9 Tilastolliset analyysit	29
10 Tulokset	30
10.1 RBA- menetelmän optimoinnin tulokset	31
10.1.1 GADA RBA:n optimoinnin tulokset	33
10.1.2 IA-2A RBA:n optimoinnin tulokset	34
10.1.3 ZnT8A RBA:n optimoinnin tulokset	35
10.2 ELISA- menetelmän optimoinnin tulokset	36
10.2.1 GADA ELISA:n optimoinnin tulokset	38
10.2.2 IA-2A ELISA:n optimoinnin tulokset	38
10.2.3 ZnT8A ELISA:n optimoinnin tulokset	39
10.3 Tutkimusten luotettavuuden arviointi	40
11 Pohdinta	40
11.1 Tulosten tarkastelu	41
11.2 Johtopäätökset	43

Lähteet

Liitteet

Liite 1. Radioisotoopilla leimattujen proteiinien valmistus

Liite 2. Pipetointikaavio GADA, IA-2A ja ZnT8A määrittelyselle RBA:lla

Liite 3. Pipetointikaavio kaikki 3 määrittelyä yhtäaikaaisesti RSR ELISA kiteillä

Liite 4. ELISA:n absorbanssit: kaikki 3 määrittelyä yhdessä

Liite 5. ELISA:n GADA tulokset (kaikki 3 määrittelyä yhdessä)

Liite 6. Yhteenveto GADA:n tuloksista (n=6) RBA:lla

Liite 7. Yhteenveto IA-2A:n tuloksista (n=6) RBA:lla

- Liite 8. Yhteenveto ZnT8A:n tuloksista (n=6) RBA:lla
- Liite 9. Yhteenveto GADA:n tuloksista (n=37) ELISA:lla
- Liite 10. GADA:n lineaarinen regressioanalyysi (n=37)
- Liite 11. IA-2A:n lineaarinen regressioanalyysi (n=37)
- Liite 12. ZnT8A:n lineaarinen regressioanalyysi (n=37)

Kiitokset

Tämä työ suoritettiin Helsingin yliopiston Lastenklinikan tieteellisessä laboratoriossa. Haluan kiittää professori Mikael Knipia siitä, että sain mahdollisuuden tehdä tätä työtä työpaikallani. Kiitos työn ohjaajalle Taina Härköselälle (FT tutkija) asiantuntevista neuvoista, tuesta ja opastuksesta työn toteutuksessa. Kiitän opettajaa Riitta Lummea työn ohjauksesta ja kommentoinnista. Lämpimät kiitokset myös epäviralliselle ohjaajalle Annakaisa Herralalle (FT tutkija) työn kommentoinnista. Kiitän myös HYKS-instituutti Lastentautilaboratorion henkilökuntaa ja erityisesti kemisti Elsa Valtosta (FL) teknisestä avustamisesta ELISA- menetelmän osalta. Kiitos myös kaikille työkavereilleni, tuesta ja kannustuksesta työprosessin aikana.

Lopuksi erityinen kiitos perheelleni kärsivällisyydestä ja kannustuksesta koko työn ajan.

Helsinki, marraskuu 2014

Mevlida Kararić

Lyhenteet ja termit

BLANKKI	Nollanäyte, jonka avulla tarkkaillaan epäspesifistä sitoutumista.
BSA	(Bovine serum albumine) – naudan seerumin albumiini
CPM	'counts per minute' (cpm),
ELISA	(Entzyme linked immunosorbent assay) - entsyymeihin perustuva immunologinen määrittämenetelmä.
GADA	Glutamiinihappodekarboksylaasi autovasta-aineet
HLA	Human Leukocyte Antigen
IAA	Insuliiniautovasta-aineet
IA-2A	Saarekesolu- 2-autovasta-aineet
ICA	Islet cell antibodies, saarekesoluvasta-aineet
PAS	Protein-A-Sepharose
PJ	Perheenjäsen
RBA	(Radiobinding assay)- Radioimmunologinen määrittäys
SA-POD	Streptavidin peroksidaasi-liuos
TBST	Tris Buffered Saline-Tween 20
TMB	kromogeeni 3,3'-5,5'-tetrametyylibentsidiini, toimii substraattina.
T1D	Tyypin 1 diabetes
ZnT8A	Sinkkitransportteriautovasta-aineet
WHO	World Health Organisation

1 Johdanto

Tyypin 1 diabetes (T1D) on autoimmuunisairaus, jossa elimistön oma immuunijärjestelmä vielä tuntemattomasta syystä alkaa tuhota haiman insuliinia tuottavia beetasoluja (Atkinson–Eisenbarth 2001: 221). Nykykäsityksen mukaan T-solut ovat vastuussa solutuhosta ja B-solujen tuottamat autovasta-aineet lähinnä merkkinä solutuhosta. Diabetekseen liittyvät autovasta-aineet ovat apuna tyypin 1 diabeteksen diagnosoimiselle ja sairastumisen ennusteelle (Bingley 1996: 1720). Autovasta-aineita käytetään myös autovasta-ainepositiivisten elinluovuttajien tunnistamisessa.

Tautiprosessin etenemisen ja haiman insuliinia tuottavien beetasolujen tuhoutumisen myötä verenkiertoon ilmestyy autovasta-aineita haiman beetasolujen eri proteiineja vastaan. Näistä merkittävimpiä ovat autovasta-aineet insuliinia (IAA), glutamiinihappodekarboksylaasia (GADA), saarekesoluantigeenia 2 (IA-2A) ja sinkin kuljetusmolekyyliä 8 (ZnT8A) vastaan (WHO 1999: 1-49; Reunanen 2006: 7-10.) Tutkimuksissa on todettu, että oireeton, esidiabeettinen vaihe voi kestää lapsilla ja nuorilla viikoista jopa vuosiin (Knip 2002: 1-2).

Opinnäytetyön aihe lähti tarpeesta kehittää ja optimoida nopea analyysimenetelmä, jotta voidaan määrittää lyhyemmässä ajassa elinluovuttajien seerumissa diabetekseen liittyviä autovasta-aineita, ja näin saada elinluovuttajan haima tarkoituksenmukaiseen jatkokäsittelyyn. Autovasta-ainepositiivisen luovuttajan haima käsitellään eri tavalla kuin autovasta-ainenegatiivisen luovuttajan. Helsingin yliopiston Lastenklinikan tieteellisessä laboratoriossa autovasta-aineet määritetään käytössä olevalla standardi 'in-house' radioimmunologisella (RBA, radiobinding assay) menetelmällä.

Opinnäytetyö suoritettiin Helsingin yliopiston Lastenklinikan tieteellisessä laboratoriossa. Opinnäytetyössä optimoitiin sekä standardi RBA- menetelmä että kaupallinen entsyymi-immunologinen määritysmenetelmä (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA RSR Ltd, Iso-Britannia). Tarkoituksena oli sekä standardi RBA- että kaupallisen ELISA- menetelmän määritysajan lyhentäminen ja optimointi nostamalla inkubointilämpötilaa 4 °C:sta huoneenlämpöön ja lyhentämällä inkubaatioaikoja. Aineistona olivat Lasten valtakunnallisen diabetesrekisterin seeruminäytteet.

Tulosten tarkastelussa kiinnitettiin huomioita saatujen tulosten toistettavuuteen, menetelmien sensitiivisyyteen ja spesifisyyteen, sekä pika- ja standardimenetelmien korrelaatioon.

2 Diabeteksen kehittyminen ja luokittelu

Diabetes (diabetes mellitus) on aineenvaihdunnan häiriö, jossa verensokeri eli glukoosi on jatkuvasti koholla. Kolmesta neljään prosentilla maailman väestöstä on diabetes, johon liittyy merkittävästi lisääntynyt riski sokeutumiseen, munuaisten vajaatoimintaan, amputaatioon ja sydän- ja verisuonitauteihin sekä keskimääräisen eliniän lyheneminen. (WHO 1999: 1-49; Reunanen 2006: 7–10; Goldenberg 2013: 8-11.) Diabetes voidaan jakaa kahteen päätyyppiin, tyypin 1 diabetekseen (T1D), nk. lasten ja nuoruustyyppin diabetes ja tyypin 2 diabetekseen (T2D), nk. aikuistyyppin diabetes. Suomessa tyypin 1 diabeteksen esiintyvyys on suurempi kuin missään muualla maailmassa. (Goldenberg 2013: 8-11.)

Diabeteksen luokittelu ja erottelu tyypin 1 ja tyypin 2 diabetekseen on tärkeää hoitokäytäntöjen takia, mutta jossain tilanteissa se saattaa olla vaikeaa. Fyysisten oireiden ja insuliiniresistenssin tunnistamisen lisäksi diabeteksen luokittelussa auttaa tyypin 1 diabetekseen assosioituvien autovasta-aineiden analysointi. (WHO 1999: 1-49; Reunanen 2006: 7-10.)

Tyypin 2 diabeteksessa insuliinin teho on heikentynyt jo vuosia ennen sairastumista (insuliiniresistenssi) ja samanaikaisesti esiintyy vaihteleva-asteinen insuliinin erityksen häiriö (Goldenberg 2013: 8-11), jolloin insuliinin säätelemä glukoosin siirtyminen verestä soluihin on häiriintynyt. Haiman saarekesolut pyrkivät tuottamaan insuliinia entistä enemmän, jotta sokeri siirtyisi soluihin. Noin kolmasosalla ihmisistä on perinnöllinen taipumus tyypin 2 diabetekseen. Perinnöllinen taipumus voi muuttua diabetekseksi mm ylipainon ja vähäisen liikunnan takia (Mustajoki 2012).

Tyypin 1 diabeteksessa kroonisen autoimmuunitulehduksen vuoksi haimassa sijaitsevat insuliinia tuottavat beetasolut tuhoutuvat hiljalleen. Edelleenkaan ei tiedetä, miksi immuunijärjestelmä häiriintyy ja mikä aiheuttaa haiman saarekesolujen tuhoutumisen. Tuhoutuminen voi johtua useista tekijöistä, kuten perinnöllisestä taipumuksesta, mutta myös virustulehduksesta ja muista ympäristötekijöistä. Tyypin 1 diabeteksessa voi olla

pitkään esidiabeteksen aika ennen taudin puhkeamista ilman havaittavia oireita. Kliiniset oireet ilmaantuvat usein vasta, kun haiman insuliinia tuottavista beetasoluista on jäljellä n. 20 %. (Harjutsalo ym. 2008: 1777; Rose-Bona 1993: 426.)

2.1 T- ja B-solujen osuus tyypin 1 diabeteksessa

Immuunivaste vieraita antigeenejä kohtaan muodostuu kahdella eri tavalla; B-solut tuottavat liukoisia vasta-aineita ja T- solut huolehtivat soluvälitteisestä puolustuksesta. T- solut jaetaan kahteen alaluokkaan näiden tehtävien mukaisesti: CD4⁺- ja CD8⁺ soluihin. B-solujen osuus tyypin 1 diabeteksessa perustuu lähinnä niiden kykyyn muokata ja esitellä tiettyjä antigeeneja T- soluille. (Tiilikainen - Vaara - Vaheeri 1998: 94.)

CD8-positiiviset solut ovat sytotoksisia tappaja T-soluja. CD8- positiiviset solut tunnistavat vieraita antigeenejä vain, kun nämä ovat yhdessä tyypin I HLA- (Human Leukocyte Antigen) antigeenin kanssa. CD8 - T solut ovat vastuussa virusten ja solunsisäisten patogeenien vastaisesta immuunipuolustuksesta. CD4⁺-positiiviset T- solut tunnistavat vieraita antigeenipeptidejä vain, kun nämä ovat tyypin II HLA- antigeenin assosioituneina. (Moss ym. 1992: 71.) CD4⁺-solut ovat välttämättömiä immuunijärjestelmälle ja ilman niitä immuunijärjestelmä ei pysty aktivoitumaan tehokkaasti. (Tiilikainen - Vaara - Vaheeri 1998: 97 - 100.)

CD4⁺-solut jakautuvat kahteen ryhmään niiden sytokiinierityksen perusteella, Th1- ja Th2- soluihin. Näiden soluluokkien tuottamien sytokiinien perusteella immuunivaste muodostuu erilaiseksi. Th1-solut auttavat pääsääntöisesti makrofageja sekä sytotoksisia T-soluja aktivoitumaan ja Th2- solut aktivoivat B-lymfosyyttejä ja edistävät vastaainetuotantoa. (Tiilikainen - Vaara - Vaheeri 1998: 94 - 99.)

Vaikka T1D:n tautiprosessin etiologiaa ei vielä tunneta, on kuitenkin hyvin paljon viitteitä siitä, että haiman tulehdusreaktion yhteydessä imusolmukkeiden dendriittisolujen antigeenien esittely lisääntyy. Dendriittisolut esittelevät näitä antigeeneja T-soluille, jolloin aktivoidut T-solut hakeutuvat haimaan saarekkeisiin. Tuloksena on Th1-painoitteinen immuunivaste, joka tuottaa runsaasti IFN- γ sytokiinia ja interleukiinia 2 (IL-2), jotka edelleen aktivoivat makrofageja toimimaan. CD4⁺-solujen fysiologinen toiminta ilmeisesti häiriintyy, jonka seurauksena alkaa beetasolujen tuhoaminen. Näyttää siltä, että T1D assosioituvat autovasta-aineet, makrofagit, B- ja T-solut ovat kaikki osallisena T1D:n patogeneesissä. (Han - Donelan - Wang ym. 2013: 380.)

2.2 Perintö- ja ympäristötekijöiden osuus tyypin 1 diabeteksessa

Tyypin 1 diabetes on krooninen, monitekijäinen sairaus. Alttius sairastua tyypin 1 diabetekseen määräytyy perintö- ja ympäristötekijöiden yhteisvaikutuksesta. T1D ei ole periytyvä sairaus, ainoastaan alttius sairastua tyypin 1 diabetekseen määräytyy pitkälti perinnöllisesti. Tutkimukset viittaavat siihen, että ympäristötekijät, kuten enterovirusinfektiot voivat laukaista taudin tai edesauttaa sairauden puhkeamista. Selitystä haetaan myös suoliston bakteerifloorasta ja varhaisesta altistuksesta viljatuotteisiin ja lehmänmaitoon sekä nopeasta lihomisesta. (Knip 2004:1158 -1163.) Ympäristön merkitystä taudin etiologiassa osoittaa se, että T1D:ta sairastavien määrä Suomessa ja lähes kaikissa länsimaissa on kasvanut 1950-luvulta lähtien viisin–kuusinkertaiseksi ja ilmaantuvuuden kasvu selittyy vain pieneltä osalta perintötekijöillä. Ympäristötekijöiden osuus T1D sairastumisvaaran määräytymisessä on vielä avoin, mutta niiden merkitys lopullisen sairastumiseen on huomattava. (Hyöty - Virtanen 2004: 1147.)

2.2.1 Perintötekijät

Kaksostutkimuksessa todettiin, että molempien identtisten kaksosten todennäköisyys sairastua tyypin 1 diabetekseen on 23–50 %, Toisaalta ei-identtisten kaksosten kohdalla vastaava luku oli ainoastaan neljä prosenttia, mikä kertoo geneettisten tekijöiden merkityksestä tyypin 1 diabeteksen synnyssä. Kaksostutkimukset viittaavat myös siihen, että geneettisten tekijöiden osuus olisi suurempi, mitä nuorimpana tyypin 1 diabetes puhkeaa. (Veijola 2004: 4-5.)

Tyypin 1 diabeteksen kehittymiseen vaikuttavat useiden eri geenien polymorfismit. Ihmisen leukosyyttiantigeenin (HLA) -proteiinit kuuluvat immunoglobuliineihin ja niillä on tärkeä rooli solujen vuorovaikutuksessa. HLA-geenialueen luokan II geenien katsotaan vastaavan noin 50 % T1D geneettisestä alttiudesta. (Barrett - Clayton - Concannon - Akolkar - Cooper - Erlich ym. 2009: 703 - 707.)

Luokan II HLA-geenit koodittavat pääasiassa antigeenejä esittelevissä soluissa ilmenyviä kalvoproteiineja. Ihmisellä kalvoproteiineja koodaa HLA II-geenialueella kolmen eri lokuksen, DR:n, DQ:n ja DP:n geenit. Näitä lokuksia voi olla vaihteleva määrä ja tietty lokus kuvataan numerolla, esim DQ1. Tärkeimmät näistä sijaitsevat kuudennen kromosomin lyhyessä haarassa. Altistavat geenit on paikannettu HLA-DQ-alueelle, ja

ne ovat normaaleja geenialleeleja, jotka esiintyvät väestössä myös aiheuttamatta tautiin sairastumista. HLA-DQ-molekyylit ovat tärkeitä immuunivasteen muodostumisessa, sillä ne tarjoavat antigeeneistä pilkotut epitoppeina toimivat peptidit T-soluille ja sitä kautta mahdollisesti osallistuvat autoimmunitettiin T1D patogeenisissä. (Ilonen 2004: 1139 -1140.) T1D:lle altistavia geeneja esiintyy noin 20 % suomalaisella kuten myös muulla valkoihoisella väestöllä, kuitenkin vain 1-2 % väestöstä sairastuu (Knip 2004:1159). Vaikka T1D autoimmuunisairauden etiologia ei ole täysin ymmärretty, on saatu vahvaa näyttöä, että lisääntyneeseen riskiin sairastua T1D:een liittyvät HLA-DR 3/4 (DQ2/DQ8) genotyyppiin. Sen sijaan HLA-antigeenityyppi DR2:lla (DQ6) on suojaavien tekijöiden dominoiva vaikutus. (Han - Donelan - Wang ym. 2013: 379.)

HLA- alueen ulkopuolisista T1D riskiin vaikuttavista geeneistä voimakkaimmin altistavia ovat kromosomin 11 lyhyessä haarassa sijaitseva insuliinigeeni (11p15), kromosomi 1:n lyhyessä haarassa sijaitseva PTPN22-geeni (1p13.2) ja CTLA-4 geeni (2q33). Muiden altistavien geenialueiden yhteisvaikutuksella on huomattava merkitys diabetesriskiin, sillä perinnöllisyydestä noin puolet selittyy HLA- alueen geeneistä. (Ilonen 2004: 1139 - 1140.)

2.2.2 Ympäristötekijät

Toistaiseksi ei tiedetä tyypin 1 diabeteksen puhkeamiseen voimakkaimmin vaikuttavaa ympäristötekijää. Kertyneet tiedot viittaavat siihen, että tyypin 1 diabeteksen ilmaantuvuus on kasvanut selvästi toisen maailmansodan jälkeen lasten ja nuorten keskuudessa ja keskimääriin sairastumisikä on laskenut. Lisäksi Euroopassa asuvilla maahanmuuttajilla, jotka ovat siirtyneet matalasta korkean T1D esiintyvyyden alueelle, on myös havaittu taudin esiintyvyyden kasvu. Nämä suuntauksat tukevat ajatusta, etteivät geneettiset tekijät yksin voi selittää nopeasti kasvavan taudin yleistymistä. (Knip 2011: 67 - 64.) On viitteitä siitä, että virukset, suoliston bakteerikanta, imetys, eräät ravintoaineet, kuten veren D-vitamiinipitoisuus, nitrosoamiinit, nitriitti, lehmänmaidon proteiinit, ja viljavalmisteet vaikuttavat sairastumisriskiin. (Hyöty - Virtanen 2004: 1149).

Laajat tutkimukset osoittavat, että ravintotekijöillä saattaa olla yhteyttä T1D synnyssä. Varhaisen lehmän maitoaltistuksen merkitystä tyypin 1 diabetekseen liittyvien auto vasta-aineiden ilmaantumisriskiin on arvioitu muutamissa seurantatutkimuksissa. (Virtanen 2004:6.) On viitteitä, että lehmänmaito ja sen sisältämää insuliiniä, joka eroaa ihmisen insuliinista kolmen aminohapon osalta, voisi olla yhteydessä T1D puhkeamiseen.

Suomessa aloitettiin vuonna 2002 ensimmäinen tyypin 1 diabeteksen ravintointerventioon pohjautuva ehkäisy tutkimus, TRIGR- tutkimus (Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk). Kansainvälisessä TRIGR- tutkimuksessa selvitetään, voidaanko tyypin 1 diabetesta ehkäistä vieroittamalla riskivauvat pitkälle hydrolysoidylle korvikkeelle tavanomaisen lehmänmaidon pohjaisen äidinmaidonkorvikkeen sijaan 6-8 ensimmäisen elinkuukauden aikana. Altistuminen lehmänmaidolle ensimmäisten elinkuukausien aikana saattaisi suoliston epäkypsyyden vuoksi aiheuttaa immunisoitumisen ja lisätä diabeteksen riskiä. (Virtanen 2004: 6.)

On viitteitä, että D-vitamiini saattaa suojata tyypin 1 diabetekseen sairastumiselta. Yhdysvaltalais tutkimuksen mukaan D-vitamiinin runsas saaminen saattaa pienentää aikuisten riskiä sairastua tyypin 1 diabetekseen. Tämän tutkimuksen tulokset koskevat vain valkoihoista väestöä. (Munger - Levin ym. 2013: 415 - 416.) Euroopassa tehdyn tutkimuksen mukaan D-vitamiinilla varhaislapsuudessa saattaa suojata tyypin 1 diabetekselta. Suomalaisessa tutkimuksessa havaittiin, että ensimmäisen elinvuoden aikainen vähäinen D-vitamiinin saanti on yhteydessä myöhempään T1D:n sairastumiseen. NOD-hiirillä tehdyissä tutkimuksissa on osoitettu D-vitamiinin ehkäisevän haiman insuliinia tuottavien β -solujen vaurioita ja tyypin 1 diabeteksen puhkeamista. (Hyöty - Virtanen 2004: 1149.) D-vitamiinin tutkimusten tulokset ovat osittain ristiriitaisia, eikä varmaa näyttöä D-vitamiinin osuudesta T1D:n sairastumiseen ole. (Miettinen ym 2012: 1291 - 1294).

Useissa tutkimuksissa on etsitty näyttöä mikrobien osuudesta tyypin 1 diabeteksen synnyssä, erityisesti enterovirusten osalta. Koe-eläimillä tehdyissä tutkimuksissa on osoitettu, että monet virukset pystyvät vaurioittamaan beetasoluja ja aiheuttamaan tyypin 1 diabeteksen kaltaisen taudin nisäkkäille. Toisaalta on havaittu, että toiset virukset voivat myös ehkäistä diabeteksen synnyn, kuten spontaanisti diabetekseen sairastuvalle NOD-hiirillä on osoitettu. Virusten osuuden selvittäminen diabeteksen puhkeamisessa ihmisillä on varsin hankalaa, koska beetasoluja vaurioittava prosessi etenee hitaasti ja voi käynnistyä jopa vuosia ennen diabeteksen oireiden ilmaantumista. Toisena ongelmana on ollut se, että esidiabettisen ihmisen haimasta ei yleensä ole mahdollista saada kudoksenäytteitä, joista olisi mahdollista seurata tautiprosessia ja etsiä merkkejä virusinfektioista. Diabeetikoiden haimasta on havaittu, että haiman beetasolut tuottavat alfainterferonia, jota syntyy virusinfektion seurauksena. (Hyöty - Virtanen 2004: 1150.)

Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet bakteerien suojaavan roolin autoimmuunisairauksien kehityksessä, kuten tyypin 1 diabeteksessa. Elintason nousu ja sen myötä lisääntynyt hygienia sekä rokotusohjelmat ovat selvästi vähentäneet lasten altistumista taudinaiheuttajille, millä saattaa olla osuutta taudin ilmaantuvuuden nousuun (Cooke 2009: 13).

3 Haiman- ja saarekesolusiirrot

Haimansiirto on yksi tehokkaimmista hoitomenetelmistä kun pyritään pitkäaikaiseen normoglykemiaan diabeetikoilla. (Lempinen - Nordin - Ekstrand ym. 2011:1365). Ensimmäinen onnistunut haimansiirto tehtiin vuonna 1966 Yhdysvalloissa. (Kelly ym. 1967.) Euroopassa ensimmäinen haimansiirto tehtiin vuonna 1972 ja kaksi vuotta sen jälkeen Pohjoismaissa. Suomessa HYKS:ssa tehtiin ensimmäinen haimansiirto vuonna 2010 munuaisten vajaatoimintaa sairastavalle tyypin 1 diabeetikolle, jolloin samanaikaisesti haiman kanssa siirrettiin myös munuainen. (Lempinen - Nordin - Ekstrand ym. 2011:1365.) Suomen lisäksi Pohjoismaissa on neljä keskusta, joissa tehdään haimansiirtoja: kolme Ruotsissa ja yksi Norjassa.

Haiman insuliinia tuottavat beetasolut sijaitsevat Langerhansin saarekkeissa, joita on haimassa tavallisesti noin miljoona. Saarekkeissa löytyvät beetasolujen lisäksi myös muita soluja, kuten glukagonia erittäviä alfasoluja ja somatostatiinia erittäviä deltasoluja. Haiman saarekesolusiirto on hoitovaihtoehto sellaisille tyypin 1 diabeetikoille, joilla on vaikeita hypoglykemian oireita ja joille on jo aiemmin tehty munuaissiirto ja näin ollen jo entuudestaan käyttävät pysyvää hyljinnänestolääkitystä. Koska valtaosa saarekkeista tuhoutuu heti jouduttuaan kosketuksiin porttilaskimon veren kanssa, tarvitaan yhtä potilasta varten usean luovuttajan saarekkeet ja hoitotoimenpidettä pitää uusia useaan kertaan. (Salmela 2007: 8.) Suomessa astui voimaan vuonna 2010 uusi elinsiirtoja koskeva laki (9 §). Elinluovutuksen saa tehdä, jos ei ole tiedossa, että vainaja eläessään olisi kieltänyt toimenpiteen. Lakiuudistuksen tarkoituksena oli mm lisätä elinsiirtoja (Toikkanen 2010).

Scandiatransplant on pohjoismainen elinsiirto-organisaatio, jonka alaisuudessa vuonna 2000 aloitti toimintansa saarakesolusiirtohanke. Hankkeen toiminnan keskuspaikka on Rudbeck- laboratorio Uppsalan yliopistossa. Pohjoismaiset elinsiirtoyksiköt työskente-

levät yhteistyössä ja huolehtivat elinluovuttajien haimojen talteenotosta ja lähettämisestä Rudbeck- laboratorioon saarekkeiden eristystä varten. Sieltä saarekkeet lähetetään edelleen saantivuorossa olevalle yhteisen pohjoismaisen jonotuslistan potilaalle. Uppsalan yliopiston saarekesolulaboratorio pystyy vastaanottamaan ja käsittelemään haimoja vuorokauden jokaisena tuntina, seitsemänä päivänä viikossa (Salmela 2007: 7.)

Vuonna 2007 Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF) käynnisti uuden tutkimusohjelman 'Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes' (nPOD). Tutkimusohjelman yhtenä tärkeänä osana on tutkia elinluovuttajien haimasta beeta- solujen toimintaa sekä tyypin 1 diabetekseen (T1D) liittyviä saarekesoluliimiöitä. Tarkoituksena on myös löytää keinoja onnistuneeseen siirtoon tarvittavien saarekkeiden määrän vähentämiseksi. Laajaan kansainväliseen tutkimus verkostoon kuuluu myös suomalainen kansallinen (PanFin) tutkimusverkosto.

Suomessa vuonna 2011 käynnistettiin uusi tutkimusohjelma tyypin 1 diabeteksen ehkäisemiseksi "Persistent Virus Infection in Diabetes Network" (PEVNET). PEVNET-tutkimusohjelma pohjautuu laajaan eurooppalaisten biopankkien ja alan huippuasiantuntijoiden muodostamaan verkostoon. Tutkimusohjelman tavoitteena on selvittää virusten osuutta tyypin 1 diabeteksen synnyssä. Tutkimusohjelmalla on mahdollisuus saada esidiabeettisen kuolleen ihmisen kudospäätteitä eri maista, joista voidaan seurata tautiprosessia ja etsiä merkkejä virusinfektioista. PEVNET tekee myös kiinteää yhteistyötä kansainvälisen JDRF:n kanssa maailmalaajuisen yhteistyöverkoston luomiseksi. (Diabetesliitto 2011.)

4 Autovasta-aineet

Vasta-aineet palvelevat immuunipuolustusta monella tavalla: ne neutraloivat mikrobeja, pystyvät aktivoimaan komplementin ja esittelevät bakteereita T-soluille sekä voimistavat tulehdusreaktion syntyä. Kun vasta-aineet kohdistuvat epätarkoituksenmukaisesti elimistön omiin rakenteisiin, puhutaan autovasta-aineista. Autovasta-aineita esiintyy kaikissa vasta-aineluokissa, mutta diagnostiikassa hyödyllisistä autovasta-aineista suurin osa kuuluu IgG- luokkaan. Kun verenkiertoon ilmaantuu autovasta-aineita, se on merkki autoimmuunitaudista tai käynnissä olevasta immunologisesta tapahtumasta.

Joillakin autovasta-aineilla voi olla myös suora patogeneettinen merkitys tautien synnyssä. (Julkunen - Miettinen 2011b: 3115.)

Autoimmuunitauteihin kuuluu suuri joukko taudinkuvaltaan hyvin erilaisia sairauksia, jotka diagnosoidaan oireiden, kliinisten löydösten, laboratoriotutkimusten ja muiden erikoistutkimusten perusteella. Usein niiden diagnostiikassa autovasta-ainetestit ovat keskeisiä, mutta niistä on hyötyä myös näiden tautien ennusteen, elinkomplikaatioiden, aktiivisuuden ja hoitovasteen arvioissa. Autovasta-aineiden esiintyminen ja erityisesti niiden pitoisuuden nousu voi ennakoida taudin puhkeamista tai hoidossa olevan potilaan taudin uusimista. Autovasta-ainemäärityksillä on käytännön merkitystä noin 40 autoimmuunitaudissa. (Julkunen - Miettinen 2011b: 3115.)

4.1 Tyypin 1 diabeteksen autovasta-aineet

Beetasoluspesifisten autovasta-aineiden ilmaantuminen verenkiertoon on merkinä tautiprosessin käynnistymisestä, ja niillä on ennusteellista arvoa tautiriskin arvioimisessa. Diagnoosi tehdään kliinisin perustein ja taudin puhkeamista voi edeltää vuosia kestävä oireeton vaihe. (WHO 1999: 1-49; Rose – Bona 1993: 426.)

Nykyisin tunnetaan viisi beetasoluspesifistä autovasta-ainetta, joilla on merkitystä tyypin 1 diabetesriskin arvioinnissa: IAA (insuliiniautovasta-aineet), GADA (glutamaattidekarboksylaasivasta-aineet), IA-2A (islet antigen 2-vasta-aineet), ZnT8A (sinkkitransportterivasta-aineet) sekä saarekesoluvasta-aineet (Islet Cell Autoantibodies, ICA).

Seurannoissa on todettu, että nuorena ilmestyvät autovasta-aineet, korkea ICA- titteri, autovasta-aineiden multipositiivisuus, pysyvä IAA:n esiintyminen ovat merkki tyypin 1 diabetekseen sairastumisen riskistä (Julkunen - Miettinen 2011a: 3125). Lisäksi, autovasta-aineiden ilmaantumista verenkiertoon on jo vuosia käytetty kliinisissä seuranta-tutkimuksissa diabeetikon perheenjäsenten tautiriskin arvioinnissa (Julkunen - Miettinen 2011b: 3115 – 3124; Siljander - Knip 2011:3746).

4.1.1 Saarekesoluvasta-aineet (ICA)

Saarekesoluvasta-aineet (ICA) koostuvat pääosin immunoglobuliinimolekyylillä G-luokkaan kuuluvasta, IgG1-molekyyleistä, jotka tunnistavat useita Langerhansin saarekkeiden solujen sisäisiä rakenteita, ja näin ollen eivät ole haiman beetasoluille spesifisiä. ICA:n kaikkia komponentteja ei ole vielä kukaan karakterisoitu, tunnetuimpia komponentteja ovat IA-2-autovasta-aineet IA-2 ja GAD-autovasta-aineet (Månsson - Tom - Landin - Olson 2001: 85 - 90.)

Saarekesoluvasta-aineita (ICA) määritetään immuunofluorosenssimenetelmällä, johon tarvitaan O-veriryhmän elinluovuttajan haimakudosta. Saarekesoluvasta-ainetasot, jotka ovat alle 10 JDFU:ta (Juvenile Diabetes Foundation Unit), tulkitaan merkityksettömiksi vasta-ainetasoiksi, ellei tutkittavilla ole muita esidiabetekseen liittyviä oireita tai biokemiallisia autovasta-aineita. Sen sijaan, 10 JDF- yksikköä suurempia saarekesoluvasta-ainepitoisuuksia pidetään merkinä jo käynnissä olevasta beetasolutuhosta ja näillä tutkittavilla on yleensä todettavissa myös muita diabetekseen liittyviä autovasta-aineita. Menetelmä on vaikea standardisoida, ja käytännön suorittamisen hankaluuden takia se soveltuu huonosti kliiniseen käyttöön. (Bringley 1996:1720; Siljander - Simell - Hiekkala 2009: 2835.)

4.1.2 Insuliiniautovasta-aineet (IAA)

Insuliini on beetasoluspesifinen autoantigeeni. Insuliiniautovasta-aineet ilmaantuvat pienillä lapsilla yleensä ensimmäisenä T1D autovasta-aineista ja ovat merkinä T1D kehityksestä (Kimpimäki ym 2001: 4782.) Tutkimukset osoittivat, että niiden taso ja yleisyys diagnoosissa korreloivat käänteisesti iän kanssa (Kikkas - Mallone - Tubiana - Rufi ym 2013: 1.) On havaittu, että merkittävästi suurentuneet IAA-pitoisuudet viittaavat nopeaan beetasolutuhoon ja sairastumiseen. Vastasairastuneista tyypin 1 diabeetikoista 20 - 60 % on IAA positiivisia, riippuen taustaväestöstä, sairastumisiästä ja geneettisestä tautitaipumuksesta. (Kimpimäki - Kulmala - Savola ym 2002: 4572; Siljander - Knip 2011:3747.)

4.1.3 Glutamaattidekarboksylaasiautovasta-aineet (GADA)

Glutamaattidekarboksylaasi (GAD) on entsyymi, joka katalysoi tärkeää aivojen inhibitorista välittäjäainetta, jolloin syntyy gamma-aminovoihappoa (GABA). Gamma-aminovoihappo säätelee insuliinin, glukagonin ja somatostaatinin eritystä. (Rabin -

Pleasic - Shapiro ym. 1994: 3183.) Useimmiten GAD-autovasta-ainepositiivisuus todetaan insuliiniautovasta-aineiden jälkeen ja ne ovat yleisimpiä murrosikäisillä ja sitä vanhemmalla iällä sairastuneilla (Tuomi - Groop - Zimmet ym 1993: 359). GADA ei ole T1D spesifinen autovasta-aine. Tutkimukset osoittivat, että tyypin 1 diabeetikoista diagnoosihetkellä on 20 – 90 % GAD- autovasta-ainepositiivisia (Seissler - Amman - Mauch ym 1993: 1394). Aikuisiällä kehittyvän tyypin 1 diabeteksen diagnostiikassa voivat vasta-ainemääritykset olla hyödyllisiä. Tällöin useimmiten käytetään GADA-määrittystä jolla katsotaan olevan ennusteellista arvoa tautiriskin kehittymisen kannalta. (Julkunen - Miettinen 2011b: 3119 - 3120; Kimpimäki - Kupila - Hämäläinen ym. 2001: 4782.)

4.1.4 Saarekesoluantigeeni-2-autovasta-aineet (IA-2A)

Saarekesoluantigeeni-2-autovasta-aineet (IA-2A, islet antigen- 2 antibodies) sitoutuvat proteiinityrofosfataasien ryhmään kuuluvaan 40 kD:n kokoiseen proteiiniin. IA-2-autovasta-aineita voidaan havaita jo varhaisessa vaiheessa, mutta useimmiten saarekesoluvasta-aine-2 positiivisuutta pidetään merkinä pitkälle edenneestä esidiabeteksestä, koska kaikista T1D autovasta-aineista IA-2A ilmenee yleensä viimeisenä. Se on T1D:lle spesifinen autovasta-aine. (Rabin - Pleasic - Shapiro ym. 1994: 3183.)

4.1.5 Sinkin kuljetusmolekyyli-8-autovasta-aineet (ZnT8A)

Sinkin kuljetusmolekyyli 8 ekspressoidaan haiman beetasoluissa, jossa se toimii osana ionikuljetuskanavaa ja mahdollistaa sinkin kuljettamisen beetasolujen insuliinia varastoiviin rakkularakenteisiin (Chimienti - Devergnas - Favier - Seve 2004: 2330). ZnT8-autovasta-aineilla on tärkeää ennusteellinen merkitys tyypin 1 diabeteksen sairastumisessa (Achenbach - Lampasona - Landherr ja ym 2009: 1881).

Autovasta-aineet sinkin kuljetusmolekyyli 8:n kohtaan ilmaantuvat useimmiten insuliiniautovasta-aineiden jälkeen ja niillä on ennusteellista arvoa TD1 sairastumisessa vasta yli vuoden ikäisillä lapsilla. Vastasairastuneista tyypin 1 diabeetikoista n. 60 - 70 %:lla on diagnoosihetkellä ZnT8-autovasta-aineita (Chimienti ym 2004: 2330; Achenbach ym 2009: 1881; Siljander - Knip 2011: 3748 - 3749.)

5 Autovasta-aineiden tutkimusmenetelmät

Opinnäytetyössä optimoidaan sekä standardi RBA-menetelmä että kaupallinen entsyymi-immunologinen määrittäminen menetelmä (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA RSR Ltd, Iso-Britannia) kolmelle eri autovasta-aineelle (GADA-, IA-2A- ja ZnT8A) Tarkoituksena on kuvata sekä standardi (in house) RBA-menetelmän että kaupallisen RSR ELISA-menetelmän optimoinnin tarkimmat yksityiskohdat.

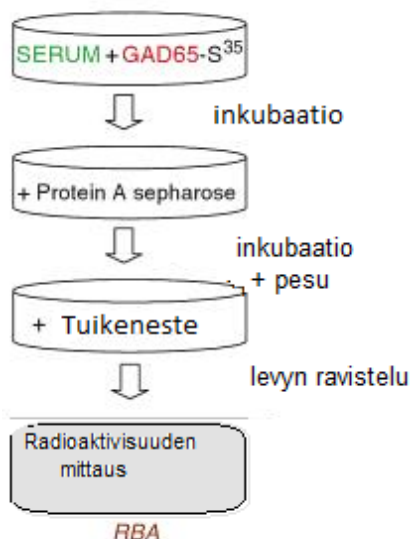
5.1 Radioimmunologinen määrittäminen (radiobinding assay, RBA)

Radioimmunologisessa (RBA) määrittämisessä radioisotoopilla leimattu antigeeni sitoutuu näytteessä olevaan vasta-aineeseen (Kuva 1). Mitä enemmän tutkittavassa näytteessä on vasta-ainetta, sitä enemmän radioaktiivista antigeeniä sitoutuu. Protein-A-Sepharosen (PAS) lisäyksen jälkeen Protein A sitoutuu immunoglobulinin Fc-osaan. Sitoutumaton leima pestään pois joko filtri- tai sentrifugaatiopesuilla ja näytteiden radioaktiivisuus mitataan nestetuikelaskurilla (Microbeta Trilux 1450, Perkin Elmer). Radioisotoopilla leimattujen proteiinien valmistus on selitetty liitteessä 1.

Lastenklinikan tieteellisessä laboratoriossa autovasta-aineiden pitoisuudet ilmoitetaan suhteellisissa yksiköissä (RU-arvolla, relative units), jotka on määritetty laboratorion omien standardilaimennossarjojen avulla. Näytteiden sisältämä radioaktiivisuus 'counts per minute' (cpm), siirtyy automaattisesti WiaCalc-ohjelmaan, jossa näytteiden vasta-ainetasot lasketaan standardisuoran perusteella.

Positiivisuuden raja-arvon määrittämiseksi käytetään terveitä verrokkeja, joiden tuloksista lasketaan positiivisen näytteen raja-arvo. Raja-arvo perustuu verrokkiaineiston 99 persenttiin, mikä tarkoittaa, että 1 % verrokkeista ylittää tämän arvon. (Savola ja ym. 1998a: 1294; Savola ja ym. 1998b: 124 - 126.) Laboratoriossamme GADA-määrittämisessä positiivisuuden raja-arvo on 5,36 RU, ja uusintarajoina 3,0 – 8,0 RU. IA-2A-määrittämisessä positiivisuuden raja-arvo on 0,77 RU ja uusintarajoina käytetään

0,58 – 2,0 RU. ZnT8A-määrittäksessä positiivisuuden raja-arvo on 0,61 RU ja uusintarajoina käytetään 0,30 – 3,0 RU. Jos uusintamäärittäksen tulos ja ensimmäisen määrittäksen tulos poikkeavat toisistaan, tehdään toinen uusinta, kunnes saadaan joko kaksi positiivista tai negatiivista tulosta, joista lasketaan keskiarvo ja tätä pidetään lopullisena tuloksena.



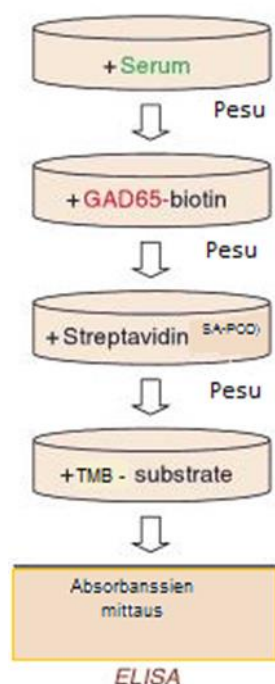
KUVA 1. RBA-menetelmän periaate (Mukaillen Unanue-Alt-McDevitt. 2008. Advanced In Immunology. vol. 100:57).

Lastenklinikan tieteellinen laboratorio on vuodesta 2002 alkaen osallistunut kansainväliseen DASP- (Diabetes Autoantibody Standardisation Program) ja IASP- (Islet Autoantibody Standardisation Program) ohjelmiin, joiden tarkoituksena on standardisoida autovasta-aineiden määrittämenetelmiä eri laboratorioissa. Näihin ohjelmiin osallistuminen osoittaa laboratorioille myös, miten hyvin niiden menetelmät pystyvät tunnistamaan positiiviset (sensitiivisyys) ja negatiiviset näytteet (spesifisyys). IASP:n puitteissa IA2A- ja GADA- määrittästen RBA menetelmän RU- arvot muutetaan standardisointiohjelman yksiköksi (WHO-yksiköiksi), mikä mahdollistaa tulosten vertailun laboratorioiden välillä.

Lastenklinikan tieteellisen laboratorion RBA - menetelmän IASP - workshop 2013 tulokset olivat seuraavat: GADA-määrittäksen herkkyys oli 70 % ja spesifisyys 98 %. IA-2A-määrittäksen herkkyys oli 62 % ja spesifisyys 100 %. ZnT8-autovasta – ainemäärittäksen herkkyys oli 62 % ja spesifisyys 99 %.

5.2 Entsyymi-immunologinen määrittäminen (ELISA)

Tutkimustyössäni käytin RSR ELISA- kittiä, jonka vasta-ainemääritys perustuu non-kompetitiivisen ELISA- määrittämenetelmään. Tässä määrittämenetelmässä mitattava vasta-aine sitoutuu kuoppalevyn pohjalle sidottuun antigeeniin. Kuvassa 2 on esitetty kaavamaisesti tässä työssä käytetyn non-kompetitiivisen määrittämenetelmän periaate. RSR ELISA- levyt on päällystetty antigeenillä, esim. GAD65-proteiinilla. Kun lisätään potilaan seerumia, seerumissa olevat vasta-aineet tarttuvat kuopassa oleviin antigeeneihin. Pesujen jälkeen lisättävä biotinyloitu GAD65-proteiini sitoutuu antigeenissa kiinni olevaan vasta-aineeseen, jolloin muodostuu sidos kuoppiin kiinnitetyn GAD65- ja biotinyloidun GAD65-proteiinien välillä. Inkuboinnin ja pesun jälkeen lisätään streptavidiniiniperoksidaasi, joka sitoutuu spesifisesti biotiiniin. Sitoutumaton streptavidiniiniperoksidaasi pestään pois ja lisätään kromogeeni 3,3'-5,5'-tetrametyyli-4-aminobentsidiini (sininen). Inkuboinnin jälkeen lisätään pysäytysliuos ja kuoppien väri muuttuu keltaiseksi. Levyt mitataan 450 nm aallonpituudella ja tulokset lasketaan testin standardinäytteiden perusteella. (Brooking ym. 2003: 331.)



KUVA 2 ELISA- menetelmän periaate (Mukaillen Unanue-Alt-McDevitt. 2008. Advanced In Immunology. vol. 100:57).

RSR ELISA - menetelmän DASP – workshop 2010 tulokset olivat seuraavat: GADAb-määrityksen herkkyys oli 90 % ja spesifisyys 94 %. Autovasta - aineen IA2 määrityksen

herkkyys oli 64 % ja spesifisyys 100 %. ZnT8Ab-määrityksen herkkyys oli 68 % ja spesifisyys 99 %.

6 Työn tarkoitus, tavoite ja tutkimusongelmat

Helsingin yliopiston Lastenklinikan tieteellisessä laboratoriossa käytössä olevalla standardi 'in-house' RBA- menetelmällä analysoidaan seerumista tai plasmasta tyypin 1 diabetekseen assosioituvien autovasta-aineiden (IA-2A, GADA, IAA ja ZnT8A) pitoisuudet. Näyteaineistona ovat mm T1D sairastuneet, alle 16-vuotiaat lapset ja heidän perheenjäsenensä sekä useiden kansainvälisten tutkimusten puitteissa saapuvat tutkimusnäytteet. Tämän lisäksi, laboratoriomme on vuodesta 2004 lähtien määrittänyt elinluovuttajien näytteistä GADA-, IA-2A-, ZnT8A- ja IAA-pitoisuudet standardi RBA-menetelmällä.

Standardi RBA-menetelmällä autovasta-aineiden määrittäysaika on lyhyimmilläänkin 24 tuntia. Tutkimustyön tarkoitus on kehittää pikamääritysmenetelmä, jolloin saisimme lyhyemmässä ajassa määrittelyksi, onko elinluovuttajien seerumissa diabetekseen liittyviä autovasta-aineita. Näin saisimme elinluovuttajan haiman tarkoituksenmukaiseen jatkokäsittelyyn: vasta-ainenegatiivisen luovuttajan haima käytetään saarekesolujen eristykseen ja elinsiirtoihin, kun taas vasta-ainepositiivisen haimasta otetaan ribonukleiinihappo- (RNA) ja erilaisia histologisia näytteitä tutkimuskäyttöön. Tavoitteena on saada tulokset noin kahdessa tunnissa siten, että tieto elinluovuttajan diabetesautovasta-aineista on selvillä haiman saapuessa Uppsalan yliopiston saarekesolulaboratorioon noin klo 9:00 Suomen aikaa.

Edellä mainitun takia, menetelmien optimoinnissa pitää ottaa huomioon, paitsi määrittelyksen luotettavuus, myös siihen kuluva aika ja kustannukset. Työssä kehitettiin pikamääritysmenetelmä kolmelle eri autovasta-aineille: GADA, IA-2A sekä ZnT8A. Koska saarekesoluvasta-aineita määritetään immuunofluorosenssi- menetelmällä, joka on vaikea standardisoida, käytännön suorittamisen takia menetelmän kehittämisen pohjaksi valittiin standardi RBA- ja RSR ELISA- menetelmät. IAA määrittämiseksi ei ollut saatavilla luotettavaa ELISA-kittiä, joten tutkimustyössäni IAA pikamääritysmenetelmä ei kehitetty. Työ pohjautuu osittain Maniatis ja kumppaneidensa (Maniatis – Yu – Miao -

Nelson – Eisenbarth ym 2001: 71 - 76.) kehittämään pikamääritysmenetelmään. Mätiäuksen ym.tarkoituksena oli kehittää ja arvioida nopea RBA- määritys diabetekseen liittyvien autovasta-aineiden (GADA, IA-2A ja IAA) tunnistamiseksi. He kehittivät nopean, kaikkien kolmen autovasta-aineen yhtäaikaisen määrityksen, joka voidaan suorittaa noin kolmessa tunnissa. Määritysaika kesti noin kolme tuntia, mikä ei ole tarpeeksi nopea meidän tarkoituksiimme.

ELISA- pikamenetelmän kehittäminen pohjautuu osittain nPOD- ja PEVNET- tutkimusohjelmissa käytössä olevaan noin kolme tunnin kestoiseen ELISA- pikamääritysmenetelmään (Fransesco Dotta - työohje).

Tutkimusongelmat ovat seuraavat:

Ongelma 1. Miten kehittää ja optimoida standardi RBA - menetelmää niin, että tulokset saadaan valmiiksi noin kahdessa tunnissa ja ne korreloivat standardi RBA- ja ELISA-tulosten kanssa?

Ongelma 2. Miten kehittää ja optimoida RSR ELISA- menetelmiä niin, että tulokset saadaan valmiiksi noin kahdessa tunnissa, ja tulokset ovat yhteneviä ELISA- kitin valmistajan ohjeiden mukaan saatujen tulosten kanssa ja ne korreloivat RBA- tulosten kanssa?

Olemme analysoineet vuodesta 2004 n. 1000 elinluovuttajan autovasta-aineet (GADA, IA-2A, IAA, ZnT8A ja ICA). Näistä n. 5 % on ollut GADA, IA-2A tai/ja ZnT8A positiivinen. Tavoitteena on tulevaisuudessa saada näiden GADA-, IA-2A- ja/tai ZnT8A-vasta-ainepositiivisten elinluovuttajien haimat diabetestutkimuksen käyttöön.

7 Toimintaympäristö ja näyteaineistot

Opinnäytetyön suorituspaikka on Helsingin yliopiston Lastenklinikan tieteellinen laboratorio, Biomedicum 1 toimitiloissa; Professori Mikael Knipin tutkimusryhmässä, joka muodostuu projektin johtajasta, tohtoritutkijoista, väitöskirjaopiskelijoista, bioanalytiikoista / laboratorioanalytiikoista, systeemisuunnittelijasta sekä koordinaattoreista, jotka koordinoivat kansallisia ja kansainvälisiä yhteistyöprojekteja. Laboratoriossamme ana-

lysoidaan vuosittain tuhansia näytteitä, joista määritetään diabetekseen liittyviä auto-vasta-aineita.

7.1 Lasten diabetesrekisterin näyteaineisto

Tutkimustyössä analysoidaan laboratoriossa käytössä olevia Lasten diabetesrekisterin seeruminäytteitä, joiden tutkimuskäytöstä on olemassa eettinen lupa. Tutkimuksessa käytetyistä näytteistä poistetaan tutkittavan tiedot ja niitä käsitellään näytenumeron perusteella. Näytekoelma kuuluu vuonna 2002 perustettuun valtakunnalliseen hankkeeseen, jonka tehtävänä on ylläpitää Lasten diabetesrekisteriä. Näytteet kerätään vastasairastuneista alle 16-vuotiaista lapsista ja heidän perheenjäsenistä. Näytteiden ottoyksiköt ympäri Suomea lähettävät näytteet Lastenklinikan tieteelliseen laboratorioon. Syyskuussa 2014, rekisterissä on noin 5100 diabeetikon ja noin 11600 perheenjäsenien näytteet. Päivittäin rekisteriin tulee lisää noin 10 näytettä.

7.2 Elinluovuttajien näyterekisteri

Diabetesrekisterin lisäksi laboratoriossamme on elinluovuttajien näyterekisteri, johon vuodesta 2004 lähtien on kertynyt noin 1000 näytettä. Transplantaatiotiimi lähettää verinäytteet HUS:n viruslaboratorioon, josta näytteet haetaan Lastenklinikan tieteellisen laboratorioon. Transplantaatiotiimi koodaa elinluovuttajanäytteet niin, että koodi sisältää haiman järjestysluvun (Elinluovuttajan hoito-ohje 2013). Lastenklinikan tieteellisessä laboratoriossa rekisteröidään näytteet, määritetään diabetekseen liittyvät autovasta-aineet sekä eristetään hepariiniverestä perifeerisen veren mononukleaariset solut Ficoll-tiheysgradienttisentrifugaatio- menetelmää käyttäen. Eristetyt solut pakastetaan -150 °C ja nestekaasufaasiin, plasma- sekä seeruminäytteet -80 °C.

8 Toteutus

Lastenklinikan tieteellisessä laboratoriossa GAD-, IA-2- ja ZnT8-autovasta-aineiden pitoisuudet määritetään seerumista tai plasmasta standardi RBA-menetelmällä. Käytössä olevalla menetelmällä tulokset saadaan vuorokaudessa. Tässä työssä tarkoitus on kehittää ja optimoida nopea analyysimenetelmä. Laboratoriossamme ja tässä työssä nopea RBA- ja nopea ELISA- menetelmä kutsutaan myös 'pika RBA- ja pika ELISA-menetelmäksi'. Tämän työn perusteella voidaan arvioida, pystytäänkö tarpeeksi nopeasti antamaan tieto elinluovuttajan T1D autovasta-aineista Upsalassa sijaitsevaan pohjoismaiseen saarekesolulaboratorioon.

Työ toteutettiin syksyllä 2013. Nopean menetelmän kehittäminen jakaantui kahteen osioon:

Ensimmäisessä osiossa kehitettiin ja optimoitiin RBA- menetelmä käyttäen ensin Lasten diabetesrekisterin kuutta seeruminäytettä. Tutkimuksen käyttöön valittiin näytteet, joista oli jo aiemmin, vuosien varrella useamman kerran määritetty IA-2A, GADA sekä standardi- että pika n. kolme tunnin RBA- menetelmällä (Maniatis ym 2001: 71 - 76). ZnT8A- määritystä ei tehty kolmen tunnin kestoisella pikamenetelmällä, joten ZnT8A oli aiemmin määritetty ainoastaan standardimenetelmällä. Jokaiselle autovasta-ainemääritykselle valittiin oma kuuden seerumin näytesarja. Nämä näytteet kuuluvat laboratoriossamme nk. harjoitusnäytteiden sarjaan, jotka käytetään uuden työntekijän tai tutkijan perehdyttämisessä. Koska autovasta-aineiden pitoisuudet olivat entuudestaan tutut, näytteet valittiin siten, että niissä oli eri määrä ja eri pitoisuuksia autovasta-aineita GAD-, IA2- ja ZnT8 vastaan sekä autovasta-ainenegatiivisia näytteitä. Määrittys toistettiin useita kertoja. Yhteenveto RBA- menetelmistä on esitetty taulukossa 1.

RBA- menetelmän optimoinnissa käytettiin myös 37 seeruminäytettä, joista 17 oli diabeetikkojen näytteitä. Diabeetikkonäytteissä oli eri määrä, erilaisia autovasta-ainepitoisuuksia. Näytteistä 20 oli ei-diabeettisten sisarusten standardi RBA:lla autovasta-ainenegatiivisia näytteitä. Tällä aineistolla haluttiin selvittää menetelmien sensitiivisyyttä, eli miten hyvin menetelmät pystyvät tunnistamaan positiiviset (17 diabeetikkoa) näytteet ja spesifisyyttä, eli miten hyvin menetelmät pystyvät tunnistamaan negatiiviset (20 ei-diabeettista sisarusta) näytteet). Lisäksi haluttiin selvittää standardi- ja nopea RBA- menetelmillä saatujen tulosten korrelaatiota.

Työn toisessa osiossa kehitettiin ja optimoitiin kaupallista ELISA- menetelmää ja tämän toteuttamiseen käytettiin samoja kuutta seeruminäytteitä kuin RBA- määrittelyn opti-

moinnissa. ELISA- menetelmä ei ole ollut aiemmin käytössä laboratoriossamme. Työssä edettiin siten, että aluksi testattiin ELISA- kittien toimivuus määrittämällä näytteet ensin RSR ELISA- kitin valmistajan ohjeen mukaan useamman kerran (Taulukko 2). ELISA- pikamenetelmän kehittäminen aloitettiin analysoimalla kuutta seeruminäytteitä ensin nPOD- ja PEVNET- tutkimusohjelman noin kolme tunnin ELISA- pika menetelmällä (Francesco Dottan työohje) (Taulukko 2). Optimointia jatkettiin mm lyhentämällä inkubointiaikoja edelleen saadaksemme pikamenetelmän, joka on tarpeeksi nopea meidän tarkoituksiimme.

Sen jälkeen analysoitiin samat 37 seeruminäytettä, joita käytettiin ensimmäisessä osiossa. Idea oli sama kuten ensimmäisessä osiossa, haluttiin selvittää standardi- ja nopean ELISA-autovasta-ainemäärityksen sensitiivisyyttä, spesifisyyttä ja tulosten korrelaatiota.

Opinnäytetyöni on osa työelämän tutkimusta ja tarkoitus on, että työpaikallani tämä työ toimii tulevaisuudessa näiden menetelmien optimointiprosessien käytännön käsikirjana. Näin ollen seuraavissa alaluvuissa kuvataan sekä RBA- että ELISA- menetelmän optimointia yksityiskohtaisesti ja meidän työpaikan vakiintuneita käsitteitä käyttäen.

8.1 Radioimmunologisen määrittelyn optimointi

RBA- kahden tunnin pikamenetelmän kehittäminen tehtiin niin, että ensin analysoitiin kuusi seerumia Maniatiksen (Maniatiksen ym 2001: 71 - 76.) ohjeiden mukaan (Taulukko 1). Tällä menetelmällä saatujen GADA ja IA-2A tulosten oli aiemmin todettu korreloivan hyvin standardimenetelmällä saatuihin tuloksiin. (Ronkainen 2003.)Tässä työssä, hyödynnettiin aiempia kokemuksia ja tuloksia.

Menetelmän kehittämistä ja optimointia jatkettiin lyhentämällä edelleen inkubaatioaikoja. Tämän lisäksi testattiin käyttövalmiiksi säädetyt ³⁵S-metioniini-leimatun proteiinin säilyvyyttä ja sulatusnopeutta. Tehtiin jokaiselle pikamääritykselle oma pipetointikaavio siten, että nestetuikelaskurin kaikki 12 detektoria ovat yhtäaikaista käytössä (Liite 2). Standardit ja kontrollit pipetoitiin valmiiksi 96-syväkuoppalevylle ja testattiin pipetoitujen näytteiden säilyvyyttä ja toimivuutta sulattamisen jälkeen. Testattiin myös näiden näytteiden sulatusnopeutta. Testaukset aloitettiin yksi autovasta-ainemääritys ja yksi muutos kerrallaan. Optimointi oli samansuuntainen jokaisen määrityksen kohdalla. Lopuksi kokeiltiin kolmen (GADA, IA-2A ja ZNT8A) määritysten samanaikaista suoritusta. Tu-

lokset koottiin Microsoft Office Excel - taulukkoon, SPSS- ja Graph Pad- ohjelmiin tilastollista analysointia varten. Nopean autovasta-ainemäärityksen kehittämistä ja optimointia jatkettiin kunnes saatiin tulokset valmiiksi noin kahdessa tunnissa ja tulokset olivat yhteneviä standardi RBA- menetelmällä saatuihin tuloksiin.

Menetelmän ollessa valmis analysoitiin 37 seeruminäytettä. Tällä aineistolla haluttiin selvittää nopean autovasta-ainemäärityksen sensitiivisyyttä, spesifisyyttä ja eri menetelmillä saatujen tulosten korrelaatiota.

Taulukko 1. Lastenklinikan tieteellisen laboratorion standardi RBA – menetelmän yhteenveto ja sen modifikaatio pikamenetelmäksi (n. 3 ja 2 tuntia).

RBA MENETELMÄN SUORITUSKAAVIO			
	RBA In-House (24h)	Pika RBA In-House (3h) (Maniatiksen menetelmän mukaan)	Pika RBA In-House (noin 2h)
Valmiiksi tehty:	-	-	Radioaktiivisella rikillä (S-35) leimattu proteiini on valmiiksi tehty, jaettu eriin ja pakastettu -80°C. Pipetoidaan 2 µl standardeja ja kontrolleja syväkuoppalevyille siten, että mikrobetan kaikki detektorit ovat yhtä aikaa käytössä. Levy päällystetään parafilmillä ja pakastetaan -80°C.
Ennen käyttöä otetaan leima ja levy huoneenlämpöön (20-25°C) sulamaan.			
Pipetoidaan:	2µl standardeja ja kontrolleja ja potilaan näytettä + 50µl radioaktiivisella rikillä (³⁵ S) leimattua proteiinia	2µl standardeja ja kontrolleja ja potilaan näytettä + 50µl radioaktiivisella rikillä (³⁵ S) leimattua proteiinia.	2µl potilaan näytettä + 50µl radioaktiivisella rikillä (³⁵ S) leimattua proteiinia.
Inkubaatio 1.	yön yli 4°C ravistelussa	1 tunti huoneen lämmössä (HL) ravistelussa	40 min. huoneenlämmössä (HL) ravistelussa
Lisätään:	Protein -A Sepharose (4 tai 8µl /50µl TBST). PAS sisältämä EtOH pestään pois ja suspensoidaan TBST-puskuriin		
Inkubaatio 2.	1tunti 4°C ravistelussa	1tunti 4°C ravistelussa	20 min. HL:ssä ravistelussa
Pesu:	GADA	GADA levyt: Sentrifugoidaan +4°C:ssa, supernatantti imetään vakuumi-imulla pois (toistetaan 5 kertaa).	
	IA-2A ja ZnT8A	IA2A ja ZNT8A näytteet siirretään kuoppalevyiltä suodatuslevyille. Pesussa käytetään vakuumi-imulaitetta (pestään 10 kertaa).	
Toimenpiteet ennen levyn laskua:			
Inkubaatio 3.	GADA inkuboidaan 30min 4°C ravistelussa Suodatuslevyt (IA-2A ja ZnT8A) kuivataan 15min.	GADA inkuboidaan 30min 4°C ravistelussa. Suodatuslevyt (IA-2A ja ZnT8A) kuivataan 1 tunti.	GADA 20min HL:ssä ravistelussa. Suodatuslevyt (IA-2A ja ZnT8A) kuivataan 10min.
Kuivaus			
Siirto: (GADA)	GADA näytteet siirretään 96-kuoppa laskulevyille, joihin on valmiiksi pipetoitu 100 µl tuikenestettä.		
IA-2A ja ZnT8A	Suodatuslevyt (IA-2A ja ZnT8A) 10 µl tuikenestettä		
Ravistelu:	GADA levyt 15-30min HL:ssä	GADA levyt 1 tunti 4°C	GADA levyt 3min. HL:ssä
Mittaus:	Näytteiden radioaktiivisuus mitataan nestetuikelaskurilla (Microbeta Trilux 1450, Perkin Elmer), laskuohjelmalla, jossa on laskuaika 5 min/kuoppa.	Radioaktiivisuus mitataan nestetuikelaskurilla (Microbeta Trilux 1450, Perkin Elmer), voimassa olevalla laskuohjelmalla, johon on laitettu laskuaika 2 min/kuoppa.	
Tulokset: Tulokset siirtyvät automaattisesti WiaCalc-ohjelmaan, jossa näytteiden RU (relative unit) -pitoisuudet lasketaan standardisuoran perusteella.			
Tulosten tulkinta:	GADA cut off: 5,360RU IA-2A cut off: 0,766RU ZnT8A cut off: 0,606RU		

8.1.2 Standardi GADA

Menetelmä on julkaistu Savola ym. artikkelissa (Savola ym 1998: 1293 -1297). Standardi RBA GAD-autovasta-ainemäärityksessä pipetoidaan 96-syväkuoppalevylle rinnakkaisnäytteinä 2 µl tutkittavaa seerumia, standardeja sekä korkea ja matala positiivinen kontrolli. Leimattu antigeeni laimennetaan TBST - puskuriin (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20, pH 7,4) siten, että kuopan aktiivisuus on 20 000 cpm / 50 µl TBST. Leimaa lisätään 50 µl / kuoppa, sentrifugoidaan reaktioseos lyhyesti ja peitetään kannella. Näytteitä inkuboidaan yön yli (+4 °C) ravistelussa.

Seuraavana päivänä muodostuneet immuunokompleksit sidotaan PAS:aan (Protein A Sepharose™ CL-4B, 17-0963, Amersham Biosciences, Uppsala, Ruotsi; sisältää 20 % etanolia). Koeputkeen pipetoidaan tarvittava PAS-liuoksen määrä siten, että jokaisen kuoppaan tulee 10 µl PAS- suspensiota. PAS:n sisältämä 20 % etanoli pestään pois lisäämällä vähintään nelikertainen määrä TBST:tä. PAS - suspensiota pipetoidaan jokaiseen kuoppaan 50 µl / kuoppa, inkuboidaan kylmässä (+4 °C) ravistelussa vähintään 60 minuuttia. PAS:aan sitoutuneet antigeeni-vasta-ainekompleksit erotetaan vapaasta leimatusta antigeenistä sentrifugipesulla (5x). Pesujen jälkeen kuoppalevyt laitetaan kylmään (+4 °C) 30 minuutin ravisteluun.

Kuoppien sisältämä radioaktiivisuus mitataan lisäämällä 100 µl tuikenestettä mittauslevyille ja siirtämällä PAS- suspensio kuoppalevyltä mittauslevyn vastaaviin kuoppiin. Levy sekoitetaan vähintään 15 min huoneenlämmössä (HL), pimeässä. Näytteiden radioaktiivisuus mitataan, laskuaika 5 min / kuoppa. Menetelmien yhteenveto on esitetty taulukossa 1.

8.1.3 GADA-pikamenetelmä

Pikamäärityksessä lyhennettiin inkubaatioaikoja ja nostettiin lämpötilaa (Taulukko 1). Tämän lisäksi radioaktiivisella rikillä (S-35) leimattu proteiini säädettiin haluttuun aktiivisuuteen, jaettiin eriin ja pakastettiin -80 °C. Standardit ja kontrollit pipetoitiin myös valmiiksi 96-syväkuoppalevylle siten, että nestetuikelaskurin kaikki 12 detektoria ovat yhtäaikaaisesti käytössä (Liite 2). Levy päällystettiin parafilmillä ja pakastettiin -80 °C. Määrityksen alkaessa otetaan leima ja syväkuoppalevy huoneenlämpöön (20 - 25 °C) sulamaan ja pipetoitiin 2 µl tutkittavaa näytettä. Päälle lisättiin 50 µl leimaa ja inkuboitiin 40 minuuttia HL:ssa ravistelussa. Inkubaatioaikana pestiin PAS ja lisättiin jokaiseen kuoppaan 50 µl PAS / TBST:tä kuten edellä standardimenetelmässä. Inkuboitiin HL:ssä

ravistelussa 20 minuuttia. Työtä jatkettiin kuten standardi RBA, mutta pesujen jälkeen kuoppalevyt laitettiin vain 4 minuutin ravisteluun. Lisäksi, ennen laskua mittauslevyt sekoitettiin ainoastaan 3 minuuttia voimakkaasti ja mittausaika laskettiin 2 minuuttiin kuoppaa kohden.

8.1.4 Standardi IA-2A

Standardi IA-2 - autovasta-ainemääritys on julkaistu Savola ym. artikkelissa (Savola ym.1998: 424 - 429). Pipetoidaan rinnakkaisnäytteinä 2 µl tutkittavaa seerumia, standardeja ja kontrolleja (korkea ja matala positiivinen kontrolli) kuoppalevyille. Radioaktiivisella rikillä (S-35) leimattu proteiini säädetään 10 000 cpm / 50 µl TBST. IA-2A määrittämisessä pesut ja mittaus tehdään filtteri-levyillä (MSHVN4B50, Millipore.) Levyt pinnoitetaan etukäteen 150 - 200 µl pinnoitusliuosta (TBST, 0.1 % Tween / 0.1 % BSA). Pinnoitettujen levyjen annetaan seistä pimeässä huoneenlämmössä kunnes niitä tarvitaan pesuvaiheessa.

Seuraavana päivänä jatketaan kuten GADA - määrittämisessä, paitsi PAS suspensoidaan TBST:n siten, että jokaiseen kuoppaan tulee 5 µl / PAS - suspensiota. PAS:aan sitoutuneet antigeeni-vasta-ainekompleksit erotetaan vapaasta leimatusta antigeenistä imulaitteella siten, että poistetaan ylimääräinen päällystysliuos filtteri-levyltä imulaitteella ja siirretään näytteet syväkuoppalevyltä vastaaville paikoille filtteri-levyn kuoppiin. Pesun aikana imulaite on kokoajan päällä. Pesujen jälkeen (10 x) poistetaan levyn pohjasta muovinen kuori ja levyjä kuivataan vetokaapissa vähintään 60 min. Kuivauksen jälkeen lisätään kuoppiin tuikenestettä 10 µl ja mitataan näytteiden radioaktiivisuus nestetuikelaskurilla kuten edellä (Taulukko 1).

8.1.5 IA-2A-pikamenetelmä

IA-2A-pikamääritys tehtiin kuten edellä, mutta noudattaen samoja poikkeuksia kuin on esitetty pika-GADA:ssa. Filtteri-levyt kuivataan vetokaapissa käyttäen hiustenkuivaajaa nopeuttaen kuoppien kuivumista (10 min). Radioaktiivisuuden mittaus nestetuikelaskurilla voimassa olevalla laskuohjelmalla, johon on laitettu laskuaika 2 min / kuoppa (Taulukko 1; Liite 2).

8.1.6 Standardi ZnT8A

Menetelmä on julkaistu Wenzlau ym. artikkelissa (Wenzlau ym 2007: 17040-5.) ZnT8A-määrityksen kulku on pitkälle sama kuin IA-2A-määrityksessä, mutta radioaktiivisella rikillä (S-35) leimatun proteiini aktiivisuus on 20 000 cpm +/- 1000 cpm / kuoppa. Lisäksi määrityksessä käyttöpuskurina on (TBST, 0.15 % Tween / 0.1 % BSA). Myös leiman teossa ja PAS:n pesussa, kuten myös filtteri-levyjen pinnoituksessa käytetään puskuria, jossa on mukana 0.15 % BSA (Taulukko 1).

8.1.7 ZnT8A-pikamenetelmä

ZnT8A-pikamääritys tehtiin kuten edellä, mutta noudattaen samoja olosuhteita ja poikkeuksia kuin on edellä kuvattu GADA- ja IA-2A pikamäärityksessä (Taulukko 1; Liite 2).

8.1.8 GADA, IA-2A ja ZnT8A-määritys yhtäaikaisesti pika RBA:lla

RBA-pikamenetelmällä kolmen autovasta-aineen määritys yhtäaikaisesti on haasteellista, lähinnä siksi, että pesut eroavat toisistaan joko pesupuskurin tai pesutavan vuoksi. Jokaiselle (GADA, IA-2A ja ZNT8A) määritykselle on valmiiksi säädettynä radioaktiivisella rikillä (S-35) leimattu proteiini pakastettu -80 °C. Jokaisen määrityksen standardit ja kontrollit on pipetoitu syväkuoppalevyille siten, että nestetuikelaskurin kaikki 12 detektoria ovat yhtäaikaisesti käytössä (Liite 2). Ensiksi sulatetaan leimat 37 °C vesihauteessa sekä otetaan jokaisen määrityksen em. syväkuoppalevyt huoneenlämpöön sulamaan. Määritys aloitetaan pipetoimalla GADA- levyille 2 µl tutkittavaa näytettä ja lisäämällä kaikkiin kuoppiin (standardit, kontrollit ja analysoitava näyte) leimaa 50 µl / kuoppa. Työtä jatketaan IA-2A- ja ZnT8A-levyjen pipetoinnilla. Levyjen pipetoinnin on oltava tässä järjestyksessä, koska GADA- määritykseen kuuluu eniten aikaa. Ensimmäisen inkubaation aikana (40 minuuttia HL) valmistetaan PAS-TBST:ssa sekä syötetään ajolistat WiaCalc:in. Lisäksi laitetaan valmiiksi käytössä olevien laskuohjelmien viivakoodit laskulevyjen mittauskasetteihin. Toisen inkubaation aikana (20 min.) järjestetään valmiiksi pesupiste ottaen huomioon sen, että GADA- ja IA-2A-määrityksessä käytetään samaa pesupuskuria. GADA- määrityksessä sitoutumaton leima pestään pois sentrifugaatiopesuilla ja IA-2A-menetelmässä filtteri-ipesulla: nämä pesut voidaan tehdä limittäin. Pyritään siihen, että GADA-levyn pesuun kuuluu n. 20 minuuttia ja IA-2A levyn pesuun ja näytteiden siirtoon yhteensä n. viisi minuuttia. Pesujen jälkeen, GADA-levyn ollessa neljä minuuttia ravistelussa suoritetaan ZnT8A levyn pesu ja näyt-

teiden siirto kuoppalevyllä filterilevylle. Radioaktiivisuus mitataan seuraavassa järjestyksessä: GADA, IA-2A ja ZnT8A. Menetelmien yhteenveto on esitetty taulukossa 1.

8.2 ELISA-määrityksen optimointi

Työn toisen osio toteutettiin käyttäen samoja seeruminäytteitä kuin RBA-määrityksen optimoinnissa. Työssä edettiin niin, että aluksi testattiin ELISA- kittien toimivuus määrittämällä (6 kpl) näytteet RSR - kitin valmistajan ohjeen mukaan useamman kerran (Taulukko 2). Kustannusten takia testaukset tehtiin GADA-kittiä käyttäen, koska se oli edullisiin, sittemmin testattiin myös IA-2A- ja ZnT8-kitin toimivuutta. Ohjeessa on annettu tarkat määräykset näytteen laadusta, pipetointivolyymistä, suoritustavasta sekä määrityksen lämpötilaolosuhteista. Pipetoinnin helpottamiseksi suunniteltiin valmiiksi pipetointikaavio. Lisäksi autovasta-ainemääritykselle haettiin Ascent Software-ohjelmassa sopivat asetukset sekä aallonpituus ja tallennettiin valmiiksi. Valittiin Multiskanin ohjelma, joka automaattisesti vähentää blankin arvo absorbanssista ja niiden pohjalta ohjelma laskee konsentraatiot.

ELISA- pakkauksen kehikossa olevat liuskat (12 kpl) ovat irrotettavissa, näin on mahdollista myöhempää käyttöä varten säästää. Kitin toimivuuden ja tuloksien yhtenevyyden lisäksi tarkasteltiin myös rinnakkaismääritysten variaatiokertoimen (CV %). Ideana oli selvittää voidaanko jatkossa tehdä määritykset ilman rinnakkaisia ja näin ollen vähentää määrityksen kustannuksia sekä pipetointiin kuuluva aikaa.

Taulukko 2. ELISA menetelmien yhteenveto RSR ELISA:n modifikaatio pikamenetelmäksi (n. 3 ja 2 tuntia).

ELISA menetelmän suorituskaavio			
Ennen käyttöä otetaan kaikk reagenssit, näytteet, standardit ja kontrollit huoneenlämpöön (20- 25°C)			
	RSR kitin valmistajan ohjeiden mukaan	Dotta'n ohje	Pikamääritys suoritus
Pipetoi:	IA-2A 50µl standardit, kontrollit sekä määritettävät näytteet +25 µl Enhancer; GADA ja ZnT8A 25µl stand., kontr. sekä näytteet (ei blankia)	25µl standardi nro2, kontrollit sekä määritettävät näytteet (ei blankia). IA-2A enhanceriä ei käytetä.	25µl standardit, kontrollit sekä määritettävät näytteet (ei blankia) IA-2A enhanceriä ei käytetä.
1. inkubaatio	IA-2A ja ZnT8A yli yön 2-8°C:ssä; ei ravisteltua; GADA 1 tunti huoneenlämmössä ravistelijassa	1 tunti huoneenlämmössä ravistelijassa	20 min huoneenlämmössä ravistelijassa
1. pesu	Pesu 3 kertaa. Lisää 100 µl pesupuskuria / kuoppa. Pesunesteen kaato ja taputus paperia vasten.	Pesu 3 kertaa. Lisää 100 µl pesupuskuria / kuoppa. Pesunesteen kaato ja taputus paperia vasten.	Pesu 3 kertaa. Lisää 100 µl pesupuskuria / kuoppa. Pesunesteen kaato ja taputus paperia vasten.
Pipetoi:	100 µl valmiiksi tehdyn Biotin-liuosta (ei blankin)	100 µl valmiiksi tehdyn Biotin-liuosta	100 µl valmiiksi tehdyn Biotin-liuosta
2. inkubaatio	1 tunti IA-2A ja ZnT8A 2-8°C:ssä; ei ravisteltua; GADA huoneenlämmössä ravistelijassa	1 tunti huoneenlämmössä ravistelijassa	20 min huoneenlämmössä ravistelijassa
2. pesu	Pesu 3 kertaa. kuten edellä.	Pesu 3 kertaa. kuten edellä.	Pesu 3 kertaa. kuten edellä.
Pipetoi:	100 µl SA-POD (laimennettu 1:20) (ei blankiin)	100 µl SA-POD (laimennettu 1:20)	100 µl SA-POD (laimennettu 1:20)
3. inkubaatio	20 min huoneenlämmössä ravistelijassa	20 min huoneenlämmössä ravistelijassa	20 min huoneenlämmössä ravistelijassa
3. pesu	Pesu 3 kertaa. kuten edellä.	Pesu 3 kertaa. kuten edellä.	Pesu 3 kertaa. kuten edellä.
Pipetoi:	100 µl TMB (blankiin myös)	100 µl TMB	100 µl TMB
4. inkubaatio	20 min huoneenlämmössä. PIMEASSA. Ei ravisteltua!	20 min huoneenlämmössä. PIMEASSA. Ei ravisteltua!	20 min huoneenlämmössä. PIMEASSA. Ei ravisteltua!
Pipetoi:	100 µl STOP- liuosta kuoppiin (myös blankiin) ja ravistelu 5 sek.	100µl STOP- liuosta kuoppiin (myös blankiin) ja ravistelee 5 sek.	100 µl STOP- liuosta kuoppiin (myös blankiin) ja ravistelee 5 sek.
Mittaa levyn absorbanssit aallonpituudella 450 nm.			
Tulostus ja analysointi	Näytteiden ja kontrollien arvot luetaan automaattisesti standardikäyrältä.	Absorbanssit luetaan 2-standardia vastaan, käyttäen Excel taulukoa	Absorbanssit luetaan Graph Pad Prismalla standardisuoralta. Ohjelma vähennä blankin
Raja-arvot: (meidän laboratorioissa)	GADA cut off: 10 U/ml IA-2A cut off: 7,5 U/ml ZnT8A cut off: 15 U/ml		

Menetelmän kehittäminen aloitettiin yksi määrittäminen kerrallaan sekä yksi muutos kerrallaan. Edettiin lyhentämällä inkubaatioaikoja ja vertailemalla tuloksia standardi- RBA-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Tavoitteena oli saada yhteneviä tuloksia ja analyysit valmiiksi noin kahdessa tunnissa.

Määrittysten kehittämisessä pyrittiin valikoimaan olosuhteet siten, että kaikki kolme määrittästä voitiin tehdä samanaikaisesti. Meidän tutkimusryhmässä ei ole omaa Multiskan- laiteetta, joten jokaisen mittausten jälkeen, siirrettiin mitatun levyn absorbanssi- että konsentraatiotulokset muistitikulle ja kirjoitettiin muistiin tarvittavat tiedot. Omalla työpaikalla tulostettiin tulokset paperille sekä koottiin ne Microsoft Office Excel - taulukoon sekä GraphPad- ohjelmaan tilastollista analysointia varten.

Koodattujen (37 kpl) seeruminäytteiden analysointi tapahtui sen jälkeen, kun kuuden seeruminäytteen ja kontrollien tulokset olivat hyväksytyissä rajoissa ja korreloivat hyvin standardimenetelmän kanssa. Tällä aineistolla haluttiin selvittää nopean, noin kahden tunnin ELISA- menetelmän sensitiivisyyttä, spesifisyyttä ja menetelmillä saatujen tulosten korrelaatiota.

ELISA- menetelmän GAD-vasta-aineen positiivisuuden raja on 10 U / ml (unit / ml). Alle 10 U / ml olevat pitoisuudet ovat negatiivisia ja sitä korkeammat arvot ovat puolestaan positiivisia. IA-2-vasta-aineiden positiivisuuden raja-arvo on 7,5 U / ml. ZnT8-autovasta-aineiden positiivisuuden rajana on 15 U / ml.

8.2.1 ELISA GADA-määrittäminen

GAD-autovasta-ainemäärittäminen ELISA-menetelmällä valmistajan (ELISA RSR TM GADAb, RSR Ltd., Cardiff, UK) ohjeen mukaan kestää yli kolme tuntia (Taulukko 2). Kaikki reagenssit, näytteet, standardit ja kontrollit pipetoidaan huoneenlämpöisenä. Käyttövalmiit standardit (5, 18, 35, 120, 250, 2000 U / ml (yksiköt ovat NBSC 97/550 mukaan), kontrollinäytteet (negatiivinen ja kaksi positiivista kontrollia) sekä seeruminäytteet pipetoidaan rinnakkaisina antigeenillä päällystettyihin näytekuoppiin 25 µl / kuoppa. Tässä vaiheessa "blankki" kuoppiin ei pipetoida mitään. Peitetään kuopat ja inkuboidaan näytteitä ravistelijassa tunnin huoneenlämmössä. Inkubaation jälkeen kuopat pestään kolme kertaa. Pesuneste (10X konsentraatti, 125 ml - liuotetaan MQ- veteen) kaadetaan pois ja ylimääräinen neste poistetaan taputtamalla paperia vasten. Pestään monikanavaisella pipetillä.

Seuraavaksi jokaiseen kuoppaan, paitsi "blankiin" pipetoidaan 100µl GAD65-Biotin-liuosta (lyofilisoituun reagenssiin lisätään GAD65-Biotin- puskuria kitin ohjeen mukaan) ja inkuboidaan ravistelijassa tunnin huoneenlämmössä. Toisen inkubaation jälkeen toistetaan pesu kuten edellä ja lisätään 100 µl SA-POD (Streptavidin peroksidaasi-liuos laimennettu SA-POD-laimennosliuokseen 1:20), ei blankiin. Näytteitä inkuboidaan 20 min huoneenlämmössä ravistelijassa, jonka jälkeen pestään viimeisen kerran. Tämän jälkeen lisätään käyttövalmiista peroksidaasi-substraattiliuosta (TMB) 100 µl / kuoppa, myös 'blankiin' ja inkuboidaan valolta suojattuna 20 minuuttia. Lopuksi lisätään reaktion pysäytysliuos. Kuoppien väri muuttuu tällöin keltaiseksi. Levyt mitataan 450 nm aallonpituudella. Tulokset siirtyivät automaattisesti Multiskanin Ascent Software-ohjelmaan, joka automaattisesti vähennä blankin arvo tuloksista. Tulokset luetaan standarditulosten perusteella

8.2.2 ELISA GADA-pikamäärittäminen

Pika ELISA-määrittelyssä lyhennettiin tunnin kestoiset inkubaatioajat 20 minuuttiin (Taulukko 2). Inkubaatiot olivat huoneenlämmössä (n. 20 °C), kuten myös RSR valmistajan ohjeen mukaisessa määrittelyssä. Laitetaan tarvittavat stripit kehikkoon, jäljelle jääneet stripit palautetaan alkuperäiseen pakkaukseen, teipataan hyvin ja säästetään myöhempää käyttöä varten.

Pikamäärittelyssä käyttövalmiina olevat standardit, kontrollit sekä määritettävät näytteet pipetoidaan yksittäisnäytteinä 25 µl / kuoppa. Peitetään kuopat ja inkuboidaan näytteitä ravistelijassa 20 minuuttia huoneenlämmössä. Inkubaation jälkeen kuopat pestään kolme kertaa pipetoimalla pesunestettä. Seuraavaksi jokaiseen kuoppaan, paitsi blankiin pipetoidaan 100 µl GAD65 Biotin- liosta ja inkuboidaan ravistelijassa 20 min HL:ssa. Toisen inkubaation jälkeen toistetaan pesu kuten edellä ja lisätään 100 µl SA-POD. Tässä vaiheessa inkuboidaan 20 min huoneenlämmössä ravistelijassa, jonka jälkeen määrittely jatkuu kuten GADA ELISA:ssa noudattaen valmistajan ohjeita. Levyn absorbanssit luetaan Multiskanin Ascent Software-ohjelmalla, kuten edellä.

8.2.3 ELISA IA-2A-määrittely

IA-2-autovasta-aineen ELISA- määrittely valmistajan (ELISA RSR TM IA-2 Ab V2, RSR Ltd, Cardiff, UK) ohjeen mukaan kestää kaksi päivää ja näyte-volyymi on (50 µl), eli suurempi kuin GAD-autovasta-aine ELISA -määrittelyssä (Taulukko 2). Ensin pipetoidaan 50 µl /kuoppaa käyttövalmiita standardeja (7.5, 35, 120, 350, 4000 U / ml, yksiköt ovat NIBSC 97/550) mukaan), positiivinen ja negatiivinen kontrolli sekä määritettävät näytteet, joiden päälle lisätään 25 µl tehostusliuosta (enhancer). Inkuboidaan yön yli 2-8 °C:ssä; ei ravistelua. Pesut suoritetaan kuten GADA ELISA- määrittelyssä. Tämän jälkeen lisätään IA-2-Biotin- liuosta ja inkuboidaan tunnin verran kylmässä (2-8 °C), ei ravistelua. Määrittely jatkuu kuten GADA ELISA:ssa noudattaen valmistajan ohjeita.

8.2.4 ELISA IA-2A-pikamäärittely

Pika IA-2A-määrityksessä ei käytetä enhanceria. Näyte-volyymi on (25 µl), eli pienempi kuin IA-2A valmistajan ohjeen mukaan ELISA- määrityksessä. Suoritus on sama kuten GADA-pikamäärityksessä (Taulukko 2).

8.2.5 ELISA ZnT8A-määritys

ZnT8-autovasta-aine-ELISA-määritys tehdään valmistajan ohjeen mukaisesti (ELISA RSR™ ZnT8Ab™, RSR Ltd., Cardiff, UK). Määrityksen ensimmäinen inkubointi on yli yön. Standardeja (10, 20, 75, 500, 2000 U / ml; yksiköt ovat RSR yksikköjä), kontrollinäytteitä (yksi negatiivinen ja kaksi positiivista) sekä määritettäviä näytteitä pipetoidaan 25 µl / kuoppa ja ensimmäisestä inkubaatiosta lähtien työn suoritus on samanlainen kuin IA-2- ja GAD-autovasta-aine ELISA-määrityksessä (Taulukko 2).

8.2.6 ELISA ZnT8A-pikamääritys

ZnT8A-pikamäärityksessä työn suoritus on samanlainen kuin IA-2- ja GAD-autovasta-aineiden ELISA-pikamäärityksessä (Taulukko 2).

8.2.7 GADA-, IA-2A-, ja ZnT8A-pikamääritys yhtäaikaaisesti RSR ELISA-kiteillä

Kolmen eri autovasta-aineen pikamääritys yhtäaikaaisesti tehtiin muokkaillen RSR- valmistajan ohjetta edellä kuvatulla tavalla. Multiskanilla tehtiin valmiiksi ohjelma, standardien ja kontrollien paikat sekä konsentraatiot oli valmiiksi ohjelmoitu. Multiskanilla mitatut absorbanssit mitataan Multiskanilla 450 nm aallonpituudella. Näytteiden ja kontrollien arvot luetaan automaattisesti standardikäyrältä. Multiskanin Ascent Software-ohjelmalla, joka automaattisesti vähentää blankin arvon tuloksista (Liite 3-5) ja ilmoittaa konsentraatiot standardisuoran perusteella.

Näytepaikat lisätään lukumäärän mukaan. Pipetoinnin helpottamiseksi on valmiiksi tehty pipetointikaavio (Liite 3). Pipetointikaavion mukaan: GADA strippi paikalle 1; IA-2A strippi paikalle 2 ja ZNT8A strippi paikalle 3. Loput stripit ja kuivausaine palautetaan alkuperäiseen pakkaukseen, suljetaan foliopussi hyvin teippaamalla ja säilytetään 4 °C:ssä.

Standardit, kontrollit sekä määritettävät näytteet pipetoidaan yksittäisnäytteinä 25 µl / kuoppa ja inkuboidaan huoneenlämmössä 20 minuuttia ravistelijassa. Ensimmäisen inkuboinnin aikana varmistetaan tarvittavien reagenssien ja liuosten volyymit ja tarvittaessa liuotetaan lisää. Pesuliuos on kaikille kolmelle määrittämiselle sama. Pesut suoritetaan monikanavaisella pipetillä. Biotin-liuos on jokaiselle määrittämiselle oma. Käyttövalmista liuosta pipetoidaan 100 µl suoraan pullosta yksikanavaisella pipetillä. Streptavidin peroxidase-liuos on sama kaikissa kolmessa määrittämisessä, joten se pipetoidaan monikanavaisella pipetillä. TMB- sekä pysäytysliuos ovat samoja kaikissa kolmessa määrittämisessä ja niitä pipetoidaan 100 µl kuoppiin monikanavaisella pipetillä. Ennen pysäytystä avataan Multiskanin Ascent Software-ohjelma valmiiksi ja varmistetaan ohjelman asetukset sekä aallonpituus (Liite 3). Pysäytyksen jälkeen mitataan levyn absorbanssit Multiskanilla 450 nm aallonpituudella. Jokaisella standardilla on määritetyt konsentraatiot U / ml. Näytteiden ja kontrollien arvot luetaan automaattisesti standardikäyrältä, Multiskanin Ascent Software-ohjelmalla, joka automaattisesti vähentää blankin arvon tuloksista. (Liite 4-5)

9 Tilastolliset analyysit

Tässä opinnäytetyössä menetelmän optimointiparametreiksi on valittu tulosten toistettavuus, korrelaatio sekä sensitiivisyys ja spesifisyys. Tuloksien käsittelyyn käytettiin tilastollisia SPSS-21 (Statistical Package for Social Science) ja GraphPad-5 ohjelmia, keskittyen lähinnä tutkittavien näytteiden standardi- ja pikamenetelmillä saatujen tulosten korrelaatioihin ja toistettavuuteen. Yleisin käytetty lineaarista riippuvuutta kuvaava tunnusluku on Pearsonin tulomomenttikorrelaatiokerroin (r). Tulomomenttikorrelaatiokerroimen arvo vaihtelee välillä (+/-) 1. Paras arvo on 1, jolloin muuttujien kaikki arvot sijoittuvat hajontakuviossa samalle suoralle viivalle. Tilastollista merkittävyyttä ja tulosten luotettavuutta mitattiin p-arvolla. Mitä pienempi p-arvo on, sitä varmemmin tulos on luotettava. Tilastollisesti merkitsevän tuloksen rajana pidetään usein p-arvoa < 0.05.

Tulosten toistettavuutta arvioitaessa laskettiin useaan kertaan analysoiduista seerumeista keskiarvot (ka), mediaani (median), minimi (min), maksimi (max), keskiarvon standardipoikkeama (SD). Lisäksi laskettiin CV % rinnakkaisista ELISA- tuloksista.

Toistettavuutta tarkasteltiin siten, että laskettiin positiivisten määrä suhteutettuna kaikkiin tuloksiin.

10 Tulokset

Opinnäytetyössäni kehitettiin ja optimoitiin RBA- ja ELISA- pikamääritys tyyppin 1 diabetekseen liittyvien autovasta-aineiden (GADA, IA-2A ja ZnT8A) tunnistamiseksi siten, että tulokset saadaan valmiiksi noin kahdessa tunnissa. RBA pikamenetelmän pohjana oli standardi ("in-house") RBA sekä Maniatis ym. (Maniatis ym 2001: 71 - 76.) julkaisema noin kolmentunnin pikamääritysohje. Tämä työ oli jo aiemmin toteutettu laboratoriossamme, mutta määritysaikaa oli liian pitkä. ELISA pikamenetelmän pohjana olivat ELISA-kitin valmistajan ohjeet sekä noin 3 tunnin ELISA- pikamääritys (Dotta - työohje). Menetelmän kehittelyyn käytettiin diabetesrekisterin näytteitä, aluksi kuutta seerumia, joissa on standardi-RBA:lla mitattuna vaihtelevia autovasta-ainepitoisuuksia, myös lähellä positiivisuuden rajaa olevia sekä autovasta-ainenegatiivisia näytteitä.. Kaikki nämä näytteet on vuosien aikana analysoitu useaan kertaan eri ihmisten toimesta laboratoriossa käytössä olevalla standardi (in house) RBA- menetelmällä. Tässä tutkimuksessa sekä RBA- että ELISA- menetelmän optimoinnissa näitä näytteitä analysoitiin useamman kerran. Poikkeuksena ZnT8A, jota ei ole tehty n. 3 tunnin kestoisella RBA-pikamenetelmällä. Kun pikamenetelmän toistettavuus ja käytännön toteutus oli hiottu loppuun, analysoitiin 37 seeruminäytettä. Tämän raportin tulostaulukoissa esiintyviä lyhenteitä ja käsitteitä on selitetty työn alussa.

Molempien menetelmien optimoinnissa käytettiin myös 37 seeruminäytettä, joista 17 oli diabeetikkojen ja 20 ei-diabeettisten sisarusten seerumeita. Diabeetikkojen näytteissä oli standardi-RBA-menetelmällä mitattuna eri määrä, erilaisia autovasta-ainepitoisuuksia, kun taas ei-diabeettisten sisarusten näytteet olivat autovasta-ainenegatiivisia. Tällä aineistolla haluttiin selvittää nopean ja standardimenetelmien korrelaatiota, sensitiivisyyttä (miten hyvin menetelmät pystyvät tunnistamaan positiiviset näytteet) ja spesifisyyttä (miten hyvin menetelmät pystyvät tunnistamaan negatiiviset näytteet).

10.1 RBA- menetelmän optimoinnin tulokset

Taulukossa 3 on yhteenveto kuuden seerumin RBA:n tuloksista. Seerumeita analysoidiin useasti kaikilla menetelmillä. Jokaisen menetelmän kohdalla määritysten keskiarvon lisäksi on esitetty kuinka monta määritystä on tehty ja kuinka moni niistä on positiivinen. Lisäksi jokaisesta määrityksestä laskettiin keskiarvo (ka) ja sen standardipoikkeama (SD) sekä minimi- että maksimi arvoja. (Liitteet 6-8).

Taulukko 3. Standardi- ja pikamääritysten vertailu käyttäen kuutta diabetesrekisterin näytettä.

RBA GADA cut-off 5,36 RU				ELISA GADA cut-off 10 U/ml							
	standardi RBA		~3h		~2h 15'		1h 45'		1h 45'		
	ka	pos	ka	pos	ka	pos	standardi	pika	pika	pos	
D1	10,84	9/9	8,51	8/9	7,02	5/7	22,0	17,9	17,0	3/3	
D2	8,86	8/9	4,46	4/9	5,98	5/7	6,9	4,7	4,5	0/3	
D3	16,74	9/9	14,73	9/9	15,97	7/7	54,3	45,5	44,6	3/3	
D4	5,59	3/9	8,35	9/9	9,16	7/7	14,7	13,7	13,0	3/3	
D5	14,50	9/9	10,65	9/9	10,60	6/7	40,4	37,8	36,2	3/3	
D6	1,86	0/9	4,32	3/9	5,33	3/7	3,1	4,2	4,2	0/3	

RBA IA-2A cut-off 0,77 RU				ELISA IA-2A cut-off 7,5 U/ml								
	satandardi RBA		~3h		~2h 15'		enhancer ei enhan		1h 45'		1h 45'	
	ka	pos	ka	pos	ka	pos	standardi	standardi	pika	pika	pos	pos
D7	6,10	9/9	7,21	12/12	6,31	5/5	60,8	79,4	93,8	102,5	4/4	4/4
D8	0,64	2/9	1,18	10/12	0,96	3/5	31,2	38,3	72,9	72,2	4/4	4/4
D9	1,37	6/8	3,52	11/12	0,77	2/5	45,6	40,5	60,6	53,4	4/4	4/4
D10	2,80	9/9	1,17	10/12	1,72	5/5	62,7	70,0	117,3	128,8	4/4	4/4
PJ1	0,10	0/8	0,46	1/12	0,32	0/5	0,9	3,5	5,4	4,4	0/4	0/4
PJ2	1,08	7/9	1,18	10/12	1,44	3/5	1,7	6,2	5,5	3,9	0/4	0/4

RBA ZnT8A cut-off 0,61 RU				ZnT8A ELISA cut off 15 U/ml							
	standardi RBA		~3h		~2h 15'		1h 45'		1h 45'		
	ka	pos	ei tehty		ka	pos	standardi	pika	pika	pos	
D11	45,87	7/7			51,07	4/4	2294,0	>st	2070,0	3/3	
D12	0,86	7/7			0,76	1/4	494,0	306,5	336,5	3/3	
D13	0,51	0/7			0,42	1/4	154,3	129,8	142,3	3/3	
D14	0,07	0/7			0,07	0/4	4,6	11,4	5,8	0/3	
D15	2,47	7/7			4,49	4/4	1810,2	3987,3	1156,7	3/3	
D16	0,55	1/7			0,64	2/4	235,0	164,3	183,3	3/3	

Taulukko 3. Diabetesrekisterin näytteistä analysoitiin useaan kertaan autovasta-aineet GAD, IA-2 ja ZnT8 antigeenejä kohtaan standardimenetelmällä ja nopealla radioimmuno- nologisella (RBA) ja ELISA menetelmällä. Jokaiseen autovasta-aineen analyysiin valittiin seerumit, joissa on standardi RBA:lla mitattuna vaihtelevia autovasta- ainepitoisuuksia. Tulokset on ilmoitettu määritysten keskiarvoina ja positiivisten tulosten määränä kaikista analyyseistä. Lisäksi RBA:n tuloksista todetaan, että kuuden seerumien toistettavuus ja positiivisuus oli hyvä positiivisten sekä matalien tiittereiden kanssa, mutta lähellä positiivisuuden raja olevilla tiittereillä oli vaihtelua positiivisuuden kanssa. ELISA- menetelmän tuloksista todetaan, että kuuden seerumin toistettavuus oli hyvä ja positiivisuus/negatiivisuusluokittelu tarkka. Sen sijaan RBA:ssa lähellä positiivisuuden raja olevilla tiittereillä oli positiivisuudessa vaihtelua.

Taulukko 4. Eri menetelmien sensitiivisyys ja spesifisyys.

	In house RBA	Pika RBA 2h 15'	Standard Elisa	Pika Elisa
17 T1D GADA (10U/ml) Sensitiivisyys	82%	82%	82%	76%
20 ei diabeettisten sisarusten GADA Spesifisyys	100%	100%	100%	100%
17 T1D IA-2A (7,5 U/ml) Sensitiivisyys	82%	71%	71%	71%
20 ei diabeettisten sisarusten IA-2A Spesifisyys	100%	100%	100%	100%
17 T1D ZnT8A (15 U/ml) Sensitiivisyys	76%	65%	88%	88%
20 ei diabeettisten sisarusten ZnT8A Spesifisyys	100%	100%	95%	100%

Taulukko 4. Diabetesrekisterin diabetekseen sairastuneiden lasten (17 näytettä) ja heidän ei-diabeetikkosisarusten (20 näytettä) autovasta-aineet (GADA, IA-2A ja ZnT8A) määritettiin sekä RBA että ELISA:n standardi- ja pikamenetelmillä. Menetelmien sensitiivisyys ja spesifisyys ovat samaa tasoa kaikilla menetelmillä, eikä menetelmien välillä ole tilastollisesti merkittävää eroa.

10.1.1 GADA RBA:n optimoinnin tulokset

Glutamaatti-dekarboksylaasiautovasta-aineiden (GADA) määrittystä tehtiin sekä standardi- (in house) että n. kolme tunnin RBA- pikamenetelmällä yhdeksän kertaa Kahden tunnin pikamääritys tehtiin seitsemän kertaa. (Taulukko 3; Liite 6) Standardimäärityksessä näytteet D1, D3, D5 ovat aina positiivisia. Näyte (D6) oli joka kerta negatiivinen. Sitä vastoin kahden, lähellä positiivisuuden rajaa (cut off) olevien näytteiden (D2, D4) positiivisuus vaihtelee määritysten välillä.

Noin 3 tunnin pikamenetelmällä määritettiin näytteet yhdeksän kertaa (Taulukko 3; Liite 6). Näytteet (D1, D3, D5), jotka olivat standardi RBA:lla joka kerta positiivisia, olivat enimmäkseen positiivisia myös pikamenetelmällä (n. 3 tunnin). Seerumi D2, joka standardimenetelmällä antoi vain kerran negatiivisen tuloksen (8/9), oli n. kolmen tunnin pikamenetelmällä neljä kerta positiivinen (4/9). Eniten vaihtelua oli positiivisuuden rajan lähellä olevien D4 ja D6 näytteiden kohdalla. Näyte D4, joka antoi standardi RBA:lla vaihtelevaa positiivisuutta, oli pikamenetelmällä positiivinen jokaisessa määrittäyksessä (9/9). Näyte D6, joka oli standardimenetelmällä joka kerta negatiivinen, oli pika (n. 3 tunnin) menetelmällä kolme kerta positiivinen (3/9).

Kahden tunnin pikamääritys antoi hyvin samanlaiset tulokset kuin kolme tunnin määrittäminen (Taulukko 3; Liite 6). Näyte D3, joka oli edellisissä menetelmissä kaikissa määrittäyksissä positiivinen, antoi myös pikamenetelmällä (n. 2 tunnin 15min) kaikissa määrittäyksissä positiivinen tuloksen. Eniten vaihtelua oli samoin kuin kolmen tunnin määrittäyksessä D6- ja D2-näytteiden kohdalla. Näyte D6, joka antoi standardi RBA:lla kaikissa yhdeksässä määrittäyksessä negatiivisen tuloksen, oli pika RBA:ssa (n. 2 tunnin 15 min) kolme kertaa heikosti positiivinen (3/7). Näyte D2, joka standardi-menetelmällä oli ainoastaan kerran negatiivinen, oli pikamenetelmällä useamman kerran negatiivinen (3/7). Yhteenvetona voidaan sanoa, että standardi- ja pikamenetelmät erottavat hyvin negatiiviset (D6 ka 1,86) ja korkeimman uusintarajan (uusintarajat 3,0 - 8,0 RU) reilusti ylittävät positiiviset vasteet (D2 ja D5, ka 16,74 ja 14,5 RU, vastaavasti) GADA-vasteet, mutta lähellä positiivisuuden rajaa (5,36 RU) on vaihtelua.

Taulukossa 4 on esitetty tutkimustulokset, jotka saatiin analysoimalla 37 seeruminäytettä standardi- ja pikamääritysmenetelmällä (2 h). Tuloksista voidaan nähdä, että mo-

lempien menetelmien sensitiivisyys ja spesifisyys oli sama (82 % ja 100 %) (Taulukko 4). Lineaarinen regressioanalyysi antoi standardi- ja pikamenetelmän väliseksi korrelaatiokertoimeksi 0,941 ($r=0,941$). Korrelaatio on tilastollisesti varsin merkitsevä ($p<0,001$) (Liite 10).

10.1.2 IA-2A RBA:n optimoinnin tulokset

Saarekesoluantigeeni-2 autovasta-aineet (IA-2A) määriteltiin standardi RBA-menetelmällä pääosin yhdeksän kertaa (Taulukko 3; Liite 7). Näistä seerumit D7 ja D10 olivat jokaisessa standardi RBA-määrityksessä positiivisia, kun taas näytteet D8, D9 ja PJ2, joiden tulokset ka olivat uusintarajojen (0,575 – 2,00 RU) sisällä, antoivat vaihtelevia tuloksia. PJ1-näyte oli kaikissa standardimäärityksissä negatiivinen (0/8).

IA-2A RBA-pikamääritys (noin 3 tuntia) tehtiin 12 kertaa (Taulukko 3; Liite 7). Seerumi D7, joka oli jokaisessa standardimäärityksessä positiivinen, oli myös pikamenetelmällä positiivinen. Näyte PJ1, joka standardi RBA:lla oli jokaisessa määrityksessä negatiivinen, oli pikamenetelmällä (n. 3 tunnin) yhden kerran positiivinen (1/12). Eniten vaihtelua oli näytteen D8-kohdalla: se oli standardimenetelmällä useimmiten negatiivinen (ka 0,64), mutta antoi pika-RBA:lla enimmäkseen positiivisia tuloksia (10/12, määritysten keskiarvo 1,180).

Noin 2 tunnin pika-RBA:lla IA-2A näytteet analysoitiin viidesti (Taulukko 3; Liite 7). Pikamäärityksessä tulokset olivat hyvin paljon samansuuntaiset kuin kolmen tunnin RBA:lla. Näytteet D7 ja D10, jotka olivat edellisissä menetelmissä kaikissa määrityksessä positiivisia, olivat myös n. 2 tunnin pikamenetelmässä kaikissa määrityksissä positiivisia. Samoin näyte PJ1, joka oli standardi-RBA:lla kaikissa määrityksessä negatiivinen, oli myös n. 2 tunnin pikamäärityksessä joka kerta negatiivinen (0/5). Vaihtelua oli positiivisuuden rajalla (0,78 RU) olevan D8-näytteen kohdalla. Näytteen D8 tulos oli kuitenkin hyvin samanlainen kuin kolmen tunnin määrityksessä. Näyte D9, joka antoi standardimenetelmällä uusintarajoissa (0,5-2,0 RU) olevan keskiarvon (1,37), antoi vaihtelevaa positiivisuutta myös pikamäärityksissä. Yhteenvedona voidaan esittää sama johtopäätös kuin GADA:n määrityksessä: positiiviset ja negatiiviset näytteet erottuvat hyvin, uusintarajoilla olevien näytteiden tulos vaihtelee negatiivisesta positiiviseen määritysten välillä riippumatta menetelmästä.

Taulukossa 4 on esitetty tulokset, jotka saatiin analysoimalla 37 diabeetikko- ja ei-diabeetikko näytettä standardi- ja kahden tunnin pikamenetelmällä. Tuloksista todetaan, että standardi-menetelmän sensitiivisyys oli 82 % ja pikamenetelmän 71 % (Taulukko 4). Molempien menetelmien spesifisyys oli (100 %). Lineaarinen regressioanalyysi antoi standardi- ja pikamenetelmän väliseksi korrelaatiokertoimeksi 0,912 ($r=0,912$). Korrelaatio on tilastollisesti merkitsevä ($p<0,001$) (Liite 11).

10.1.3 ZnT8A RBA:n optimoinnin tulokset

Sinkkitransportterivasta-aineiden- (ZNT8A) määitykset tehtiin seitsemän kertaa standardi-RBA:lla (Taulukko 3; Liite 8). Kahden tunnin pikamääitys tehtiin neljä kertaa. Kolmen tunnin RBA- menetelmällä ZNT8A- määityksiä ei tehty.

Standardi RBA- menetelmällä näytteet D11, D12 ja D15 ovat jokaisessa määityksessä positiivisia. Näytteet D13 ja D14 olivat jokaisessa määityksessä negatiivisia. (Taulukko 3)

Kahden tunnin pikamenetelmällä ZnT8A:n tulokset olivat hyvin samansuuntaiset kuin standardimenetelmällä: näytteet D11, D15, jotka antoivat standardi-menetelmällä jokaisessa määityksessä positiivisen tuloksen, olivat myös pikamenetelmällä jokaisessa määityksessä positiivisia, näyte D14, joka oli joka kerta negatiivinen standardi-menetelmällä, oli myös pikamenetelmällä joka kerta negatiivinen (Taulukko 3; Liite 8). Toisaalta, uusintarajojen sisällä oleva näyte D12, joka oli standardimenetelmällä joka kerta positiivinen (ka 0,86 RU), antoi pikamenetelmällä vain kerran positiivisen tuloksen (ka 0,76 RU). Positiivisuuden rajan lähellä oleva näyte D16, joka oli standardi-menetelmällä seitsemässä eri määityksessä vain kerran positiivinen (ka 0,55 RU), oli pikamenetelmällä vaihtelevasti positiivinen (2/4, ka 0,64 RU).

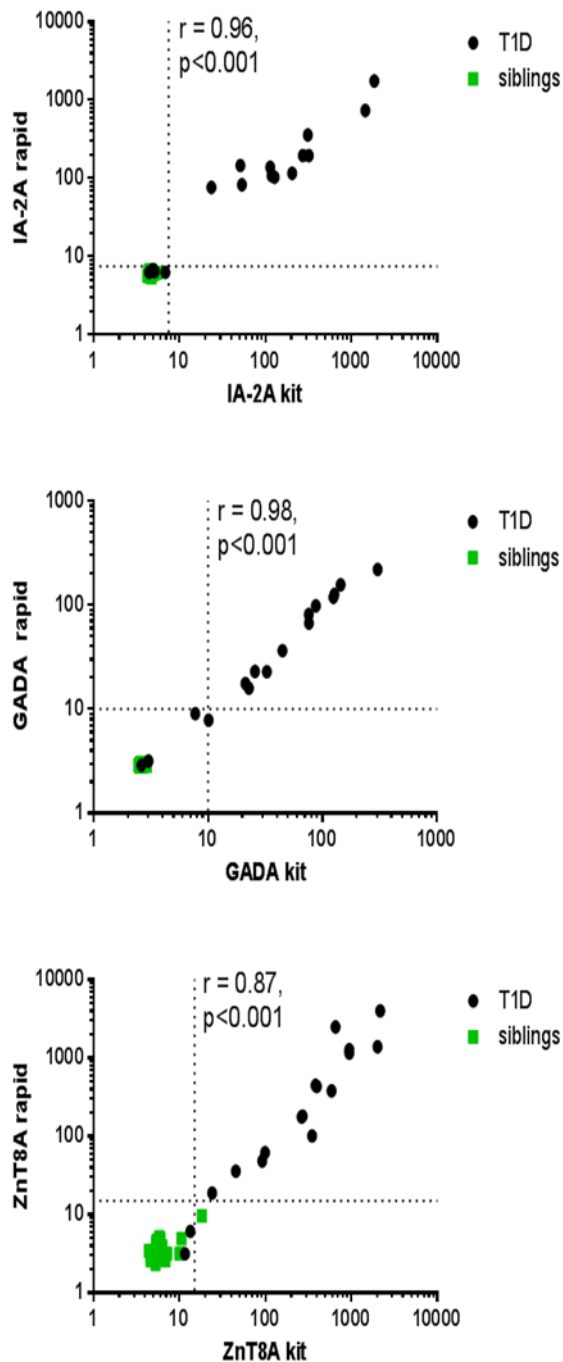
Nopean ja standardimenetelmien korrelaatiota, spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä testattiin koodattujen näytteiden otoksella. Tuloksista todetaan, että standardi-RBA-menetelmän sensitiivisyys oli 76 % ja RBA-pikamenetelmän 65 %. Molempien menetelmien spesifisyys oli (100 %) (Taulukko 4). Lineaarinen regressioanalyysi antoi ZnT8A RBA väliseksi korrelaatiokertoimeksi 0,86 ($r=0,86$). Korrelaatio on tilastollisesti merkitsevä ($p<0,001$) (Liite 12).

10.2 ELISA- menetelmän optimoinnin tulokset

Kuuden seeruminäytteiden tuloksista ELISA- menetelmän yhteenveto on esitetty taulukossa 3. Jokaisen menetelmän kohdalla määritysten keskiarvon lisäksi on esitetty kuinka monta määritystä on tehty ja kuinka moni niistä on positiivinen.

ELISA- menetelmän optimointi suoritettiin kolmessa erillisessä autovastainemäärityksessä. ELISA-menetelmällä kuuden seeruminäytteen määrityksiä tehtiin vähemmän kuin RBA- menetelmällä. Jokaisen menetelmän kohdalla määritysten keskiarvon lisäksi on esitetty kuinka monta määritystä on tehty ja kuinka moni niistä on positiivinen (Taulukko 3).

Analysoimalla ELISA- menetelmällä samoja 37 seeruminäytettä, jotka käytettiin myös RBA- menetelmällä, haluttiin selvittää nopean ja standardi-ELISA-menetelmän korrelaatiota, sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä. (Taulukko 4; Kuva 3). Lisäksi laskettiin CV % rinnakkaisista GADA:n tuloksista (Liite 9).



Kuva 3. ELISA-standardi- ja pikamenetelmillä saatujen GADA, IA-2A ja ZnT8A tulosten välinen korrelaatio analysoitiin määrittämällä 17 diabeetikon ja 20 ei-diabeettisen sisaruksen autovasta-aineet. Mustat pisteet ovat diabeetikkojen näytteitä, vihreät pisteet ovat ei-diabeettisten sisarus-ten, standardi 'in-house' menetelmällä autovasta-ainenegatiivisia näytteitä. ELISA- menetel-mien välillä on voimakas lineaarinen korrelaatio ($r=0.96$, 0.98 ja 0.87 , GADA, IA-2A ja ZnT8A)

10.2.1 GADA-ELISA:n optimoinnin tulokset

Kuuden näytteen ELISA-menetelmän tulokset on esitetty taulukossa 3. GADA- määrittäminen tehtiin kolme kertaa ja tulokset olivat kaikki yhteneviä keskenään, ne olivat kaikki joko positiivisia tai negatiivisia. Näytteet D1, D3 ja D5, jotka olivat standardi-RBA- menetelmällä jokaisessa määrittäyksessä positiivisia, olivat myös ELISA:lla aina positiivisia. Samoin D6, joka oli kaikissa standardi-RBA-määrittäyksissä negatiivinen, oli negatiivinen aina myös ELISA:lla. Yhden näytteen (D2) ELISA- tulos poikkesi RBA- menetelmän tuloksista. ELISA- menetelmällä kolme kertaa määritetty D2 näyte antoi aina negatiivisen tuloksen, kun taas standardi-RBA:lla näyte oli yhdeksästä määrittäyksestä kahdeksan kertaa positiivinen (8/9), kolmen ja kahden tunnin RBA:lla vastaavasti positiivinen 3/9 ja 3/7.

Standardi- ja pikamenetelmien sensitiivisyys ja spesifisyys määritettiin analysoimalla aiemmin kuvatut 37 diabetesrekisterin näytettä. Standardi GADA-ELISA:n sensitiivisyys on 82 % ja pikamenetelmän 76 %. Molempien menetelmien spesifisyys oli 100 % (Taulukko 4). Lineaarinen regressioanalyysi antoi pika- ja standardi-ELISA-menetelmien väliseksi korrelaatiokertoimeksi 0,980 ($r=0,980$). Korrelaatio on tilastollisesti hyvin merkitsevä ($p<0,001$). (Kuva 3; Liite 10). Lineaarinen regressioanalyysi antoi pika-ELISA:n ja standardi-RBA:n väliseksi korrelaatiokertoimeksi 0,934 ($r=0,934$). Menetelmien välinen korrelaatio oli tilastollisesti merkitsevä ($p<0,001$). (Liite 10).

10.2.2 IA-2A-ELISA:n optimoinnin tulokset

Kuuden seeruminäytteen IA-2A määrittäminen tehtiin ELISA:lla neljästi (Taulukko 3). ELISA:ssa ei ole positiivisuuden vaihtelua, tulokset olivat toistettavia keskenään. Näytteet D7 ja D10, jotka antoivat standardi RBA- menetelmällä jokaisessa määrittäyksessä positiivisen tuloksen, olivat myös ELISA-menetelmällä jokaisessa määrittäyksessä positiivisia. Näyte PJ1, joka RBA:lla oli negatiivinen, oli myös ELISA:lla joka kerta negatiivinen. Positiivisuuden rajalla oleva näyte D8, joka RBA:ssa antoi vaihtelevaa positiivisuutta, oli ELISA:ssa aina positiivinen. Samoin standardi-RBA:lla uusintarajoissa oleva PJ2-näyte, joka oli useimmissa RBA-määrittäyksissä positiivinen, oli ELISA:ssa aina negatiivinen.

Taulukossa 4 on esitetty standardi- ja pika ELISA- menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys. Tuloksista voidaan todeta, että molempien ELISA- menetelmien IA2-A-määritysten sensitiivisyys oli 71 %. Molempien menetelmien spesifisyys oli 100 % (Taulukko 4). Lineaarinen regressioanalyysi antoi ELISA-standardi- ja pikamenetelmien väliseksi korrelaatiokertoimeksi 0,956 ($r=0,956$). Korrelaatio on tilastollisesti merkitsevä ($p<0,001$) (Kuva 3; Liite 11). Lineaarinen regressioanalyysi antoi IA-2A:n pika ELISA:n ja standardi-RBA:n väliseksi korrelaatiokertoimeksi 0,707 ($r=0,707$). Korrelaatio on tilastollisesti merkitsevä ($p<0,001$) (Liite 11).

10.2.3 ZnT8A-ELISA:n optimoinnin tulokset

ELISA - menetelmän ZnT8A määityksessä kuuden seeruminäytteiden tulokset ovat yhteneviä keskenään (Tauluko 3). ELISA:ssa ei ole positiivisuuden vaihtelua, tulokset olivat keskenään toistettavia. Näytteet D11, D12 ja D15, jotka antoivat standardi RBA-menetelmällä jokaisessa määityksessä positiivisen tuloksen, olivat myös ELISA menetelmillä jokaisessa määityksessä positiivisia. Näyte D14, joka RBA:lla oli negatiivinen, oli myös ELISA:lla joka kerta negatiivinen. Kuitenkin, RBA menetelmillä lähellä positiivisuuden rajaa olevat näytteet D13 ja D16, jotka RBA menetelmillä olivat enimmäkseen negatiivisia, olivat ELISA:lla joka kerta positiivisia.

Taulukossa 4 on esitetty tulokset, jotka saatiin analysoimalla 37 seeruminäytettä standardi- ja pika-ELISA:lla. Tuloksista voidaan todeta, että molempien menetelmien sensitiivisyys oli sama (88 %). Standardimenetelmän spesifisyys oli 95 % ja pika- ELISA:n spesifisyys oli 100 % (Taulukko 4). Lineaarinen regressioanalyysi antoi menetelmien väliseksi korrelaatiokertoimeksi 0,868 ($r=0,870$). Korrelaatio on tilastollisesti merkitsevä ($p<0,001$) (Kuva 3; Liite 12). Lineaarinen regressioanalyysi antoi pika- ELISA:n ja standardi-RBA:n väliseksi korrelaatiokertoimeksi 0,827 ($r=0,827$). Korrelaatio on tilastollisesti merkitsevä ($p<0,001$). (Liite 12).

10.3 Tutkimusten luotettavuuden arviointi

Oman opinnäytetyön menetelmien ja tuloksien luotettavuutta tukee se, että sekä tutkimuksen tekijä että tutkimuksen ohjaaja ovat hyvin perehtyneet aiempiin tämän kaltaisiin tutkimuksiin ja menetelmiin. Tutkimus on hyvin suunniteltu ja toteutettu. Näin ollen tekijästä riippuvia virheitä on minimoitu. Luotettavuuteen ja oikeellisuuteen vaikuttaa myös se, että tein tutkimuksen laboratoriossa, jossa diabetekseen liittyvien autovasta-aineiden tutkimus on korkeaa kansainvälistä tasoa.

Opinnäytetyössä on tuotu esille kaikki tutkimukseen liittyvät asiat, kuten ratkaisut, jotka koskevat menetelmien valintaa sekä tutkittavien näytteiden laatua ja määrää. Myös eettiset ratkaisut on tuotu yksityiskohtaisesti esille niin, että kuka tahansa perehtynyt voi arvioida tutkimuksen kulkua ja tehdä johtopäätökset tuloksien luotettavuudesta. Lisäksi, työn toisessa osiossa, näytteet analysoitiin sokkona eikä koodia tiennyt työnohjaaja eikä tekijä. Koodauksen avulla varmistettiin sitä, ettei tämän tutkimuksen tutkimustehtävä ohjannut työn toteutusta. Työssä on näin noudatettu hyvän tutkimuksen perusvaatimuksia.

11 Pohdinta

Tyypin 1 diabetes assosioituvia autovasta-aineita (GADA, IA-2A, IAA, ZnT8A ja ICA) käytetään apuna diabeteksen diagnoosissa ja niiden avulla pystytään ennustamaan diabetesriskiä sairastuneen perheenjäsenissä ja väestössä (Julkunen - Miettinen 2011b: 3115 – 3124; Siljander - Knip 2011:3746). Maniatiksen tutkimusryhmä julkaisi jo vuonna 2001 radioimmunologisen (RBA) menetelmän, jossa GADA, IA-2A ja IAA tulokset saatiin määritetyksi n. kolmessa tunnissa ja tulokset korreloivat hyvin standardi-RBA:n kanssa. Eniten ristiriitaa oli IAA tuloksissa. (Maniatiksen ym 2001: 71 - 76). Heidän ohjeisiin pohjautuen, laboratoriossamme testattiin menetelmän toimivuus analysoimalla diabeetikoiden ja heidän perheenjäsenten autovasta-aineet (GADA, IA2A ja IAA) sekä käytössä olevalla standardi ('in-house') RBA menetelmällä että pikamäärityksellä (Ronkainen 2003). Pikamenetelmän korrelaatio oli hyvä in-house RBA- menetelmän kanssa, mutta määrittäysaika kesti noin kolme tuntia, mikä ei ole tarpeeksi nopea elinluovuttajien diabetekseen liittyvien autovasta-aineiden määrittämiseksi meidän tarkoituksiimme. Meidän tavoitteena on saada elinluovuttajan autovasta-aine tulokset selville noin kah-

dessa tunnissa. Pikamenetelmää voidaan hyödyntää haimansiirron yhteydessä, jolloin tarvitaan nopeasti arvio haiman kelpoisuudesta elinluovutukseen tai mahdollista käytöstä diabetestutkimuksessa.

Kaksi tutkimusohjelmaa, vuonna 2007 aloittanut 'Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes' (nPOD) ja vuonna 2011 aloittanut "Persistent Virus Infection in Diabetes Network" (PEVNET) käyttää elinluovuttajien T1D autovasta-ainemäärityksiin RSR-ELISA menetelmää, jota he ovat muokanneet siten, että GADA, IA-2A ja ZnT8A saadaan määritetyksi n. kolmessa tunnissa (ns Dotta-ohje).

Tässä työssä esitellään kolmen T1D autovasta-aineen (GADA, IA-2A ja ZnT8A) yhtäaikainen radioimmunologinen (RBA) ja ELISA määritysmenetelmä, joka voidaan suorittaa noin kahdessa tunnissa. Tutkimus suoritettiin Helsingin yliopiston Lastenklinikan tieteellisessä laboratoriossa. Näyteaineistona olivat Lasten valtakunnallisen diabetesrekisterin seeruminäytteet. Edellä olevat kuvaukset aikaisemmista menetelmistä käytettiin tässä menetelmien optimoinnin lähtökohtana. Menetelmien kehitystä jatkettiin mm lyhentämällä edelleen inkubointiaikoja ja nostamalla inkubaatiolämpötilaa.

11.1 Tulosten tarkastelu

RBA-menetelmän kehittämisen ja optimoinnin aikana kuutta seeruminäytettä analysoitiin useamman kerran RBA- menetelmillä. Näistä näytteistä oli jo aiemmin, vuosien varrella useamman kerran määritetty IA-2A, GADA sekä standardi- että n. kolme tunnin RBA- pikamenetelmällä (Maniatis ym 2001: 71 - 76). ZnT8A- määrittystä ei tehty kolmen tunnin kestoisella pikamenetelmällä, joten ZnT8A oli aiemmin määritetty ainoastaan standardimenetelmällä.

RBA- menetelmän tuloksista voidaan todeta, että kuuden seerumin toistettavuus oli hyvä ja positiivisuus/negatiivisuus-luokittelu tarkka positiivisten ja matalien autovasta-ainetiittereiden kanssa, mutta lähellä positiivisuuden rajaa olevilla tiittereillä oli positiivisuudessa vaihtelua. Laboratoriossamme jokaiselle autovasta-aineille on määritetty omat uusintarajat. Jos uusintamäärityksen tulos ja ensimmäisen määrittelyn tulos poikkeavat toisistaan, tehdään toinen uusinta, jotta saadaan joko kaksi positiivista tai negatiivista tulosta, joista lasketaan keskiarvo ja tätä pidetään lopullisena tuloksena. Näin ollen on luonnollista, että lähellä positiivisuuden rajaa olevat vasteet saattavat olla

ristiriitaisia. Vain yhdelle matalatiitteriselle autovasta-aineelle positiivisen luovuttajan haima ei ole kuitenkaan yhtä informatiivinen kuin vähintään kahdelle autovasta-aineelle positiivisen luovuttajan haima.

Toisin kuin RBA-menetelmällä, ELISA menetelmällä saadut tulokset eivät olleet ristiriitaisia keskenään, edes näytteissä, joissa vasteet olivat RBA:lla lähellä positiivisuuden rajaa. Yksinkertainen lineaarinen regressioanalyysi osoitti vahvan korrelaation standardi- ja nopea ELISA:n määrittämisen välillä. ELISA- menetelmien välinen korrelaatio oli jopa voimakampi kuin RBA- menetelmien välinen korrelaatio. Molempien menetelmien välinen korrelaatio oli tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p < 0,001$).

Lineaarista regressioanalyysia sekä sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittämistä varten analysoimme 37 diabetesrekisterin näytettä (17 diabeetikko, 20 ei-diabeettista sisarusta) standardi ja pikamenetelmällä. Yksinkertainen lineaarinen regressioanalyysi osoitti erinomaisen korrelaation standardimäärittämisen ja nopean määrittämisen välillä. Molempien menetelmien sensitiivisyys GADA-määrittysten kohdalla vaihteli 76 %:n ja 82 %:n välillä. Spesifisyys oli 100 %, eikä menetelmien välillä ollut juurikaan eroa. IA-2A-määrittysten kohdalla sensitiivisyys vaihteli 71 %:n ja 82 %:n välillä. Myös IA-2A:n spesifisyys oli 100 %. ZnT8A-määrittysten kohdalla sensitiivisyys vaihteli 65 %:n ja 88 %:n välillä. Spesifisyys vaihteli 95 %: ja 100 %:n välillä.

Spesifisyyttä arvioitaessa on huomattava, että näytteistä 20 oli ei-diabeettisten sisarus-ten standardi-RBA:lla autovasta-ainenegatiivisia näytteitä, joten tulos ei anna todellista kuvaa spesifisyydestä, mutta kertoo että spesifisyys on vertailukelpoinen in house RBA:n kanssa.

Raportin tulososiossa esitetyjen tulosten perusteella voidaan vetää johtopäätös siitä, kuinka eri menetelmillä saatiin yhteneviä tuloksia. Olemme analysoineet D2-näytteen GADA-tuloksen poikkeavuutta, jossa ELISA ei tunnistanut yhden RBA-menetelmällä GADA positiivisen näytteen. Testaamalla epitooppispesifisyyttä havaittiin, että sen näytteen vasta-aineet kohditsuvat NH2-pään epitooppiin. ELISA- menetelmä ei tunnista NH2-pään epitooppeja. On viitettä siitä, että jos GAD-vasta-aineet kohdistuvat vain NH2-pään epitooppeihin, tällaiset autovasta-aineet ennustavat heikosti T1D:tä.

Sekä RBA:lla että ELISA:lla saadut tulokset riittävät meidän tarpeisiin. Autovasta-aineiden (GADA, IA-2A ja ZnT8A) määrittämisellä pikamenetelmällä pystytään noin

kahden tunnin kuluttua määritysten aloittamisesta ilmoittamaan elinluovuttajan T1D autovasta-ainepositiivisuudesta Upsalassa olevan pohjoismaisen saarekesolulaboratorioon, eli jo ennen tai samaan aikaan, kun suomalaisen elinluovuttajan haima saapuu Uppsalaan.

Olemme analysoineet vuodesta 2004 noin 1000 elinluovuttajan autovasta-aineet (GADA, IA-2A, IAA, ZnT8A ja ICA). Näistä n. 5 % on ollut GADA-, IA-2A tai/ja ZnT8A-positiivisia. Lastenklinikan tieteellisen laboratorion tavoitteena on tulevaisuudessa tehdä yhteistyötä Uppsalan yliopiston saarekesolulaboratorion kanssa ja mahdollisesti muiden tutkimusohjelmien kanssa ja määrittää T1D-autovasta-aineet pikamenetelmällä heti kun saadaan elinluovuttajan seerumi- tai plasmanäyte tieteelliseen laboratorioon. Myöhemmin elinluovuttajan kaikki biokemialliset autovasta-aineet määritetään RBA-standardimenetelmillä. ICA analysoidaan immunofluorisensimentelmällä Oulun lastenklinikan tutkimuslaboratoriossa.

11.2 Johtopäätökset

Tutkimustyössäni on kehitetty ja optimoitu nopea sekä RBA- että ELISA-määritysmenetelmä tyypin 1 diabetekseen liittyvien autovasta-aineiden (GADA, IA-2A ja ZnT8) tunnistamiseksi. Kummallekin menetelmälle on kehitetty nopea, kaikkien kolmen autovasta-aineen yhtäaikainen määrittäminen, joka voidaan suorittaa noin kahdessa tunnissa. IAA-pikamääritysmenetelmä ei optimoitu, koska IAA määrittämiseksi ei ollut saatavilla riittävästi luotettavaa ELISA-kittiä. Lisäksi teoreettisena oletuksena oli se, että lyhyt inkubaatio heikentää IAA-määrityksen sensitiivisyyttä, joten IAA jätettiin pois.

Tutkimusongelmien selvittelyn osalta toteutus sujui hyvin ja näyteotos oli riittävä luotettavien tutkimustuloksien saamiseksi. RBA-pikamenetelmän kolmen autovasta-aineen määrittäminen yhtäaikaisesti on haasteellista lähinnä siksi, että pesut eroavat toisistaan joko pesupuskurin tai pesutavan vuoksi. Jokaiselle autovasta-aineelle on oma levy, niitä ei voi yhdistää kuten ELISA-menetelmissä. ELISA:lla kolmen eri autovasta-aineen pikamääritys yhtäaikaisesti on helpompaa kuin RBA:lla.

ELISA:ssa ei tarvitse tehdä reagensseja etukäteen valmiiksi eikä pitää pipetoida standardeja ja kontrolleja etukäteen levyille. ELISA-tulos voidaan saada pipetoimalla levyille ainoastaan yhden standardin kun taas RBA:ssa tarvitaan useamman standardin.

ELISA- määrittelyksissä stripit pystyy irrottamaan levyltä ja siirtää valmiiksi tehdyn pipetointikaavion mukaan. ELISA:ssa kaikissa kolmessa määrittelyksessä voidaan käyttää sama pesupuskuria ja myös muita reagensseja. Ainoastaan Biotin-liuos on jokaiselle määrittelykselle omaa, mikä huomattavasti helpottaa työn suoritusta verattuna RBA:han, jossa on eri pesupuskurit, ja silloin kun puskuri on sama, pesutapa on eri (vakuumi- / sentifuugipesu). Pika-ELISA on siis helpompi, yksi tekijä pysty määrittämään kaikki kolme määrittelystä kahden tunnin aikana. Toisaalta se on kalliimpi kuin RBA-menetelmä. Pika RBA-menetelmä on hankalampi työn suorituksen osalta, mutta selvästi halvempi kuin pika ELISA. Jos tulevaisuudessa ruvetaan suorittamaan kaikki kolme T1D-autovasta-ainemäärittelystä yhtäaikaaisesti, suosittelisin ELISA- menetelmä, koska RBA-pikamenetelmällä kolmen autovasta-aineen määrittely yhtäaikaaisesti on haasteellista.

Pikamenetelmän kehitystä ei tarvitse toistaiseksi jatkaa sen nopeuden- eikä luotettavuuden takia. Tulevaisuudessa olisi kuitenkin hyvää kehittää IAA-pikamenetelmä, jolloin voitaisiin näiden kolmen (GADA, IA-2A ja ZnT8A) autovasta-aineen yhtäaikaisen määrittelyksen sijaan suorittaa kaikkea neljää yhtäaikaista määrittelyä.

Lähteet

- Achenbach P. - Lampasona V.- Landherr U. ym. 2009. Autoantibodies to zinc transporter 8 and *SLC30A8* genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* 52: 1881-8.
- Atkinson MA. - Eisenbarth GS. 2001. Type 1 diabetes new perspective on disease pathogenesis and treatment: *Lancet* 358: 221-9.
- Barrett JC. - Clayton DG.- Concannon P. - Akolkar B. - Cooper JD. - Erlich HA. ym. 2009. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat.Genet* 41:703-707.
- Bingley PJ. 1996. Interactions of age, islet cell antibodies, and first phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in ICA+ relatives the ICARUS data set. Islet cell antibody register users study. *Diabetes* 45: 1720-8.
- Bonifacio E. - Lampasona V. - Ganovese S. ym. 1995. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and target of islet-cell antibodies. *J. Immunol.*155: 5419-5426.
- Brooking H. ym. 2003. A Sensitive non-isotopic assay for GAD65 autoantibodies. *Clinica Chimica Acta* 55: 331-59.
- Brown C. T. - Davis-Richardson A G. - Giongo A. Hyöty H. ym. 2011. Gut Microbiome Metagenomics Analysis Suggests a Functional Model for the Development of Autoimmunity for Type 1 Diabetes. *Public Library of Science* 6(10): 1-9.
- Chimienti F.- Devergnas S.- Favier A.- Seve M. 2004. Identification and cloning of a β -cell - specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53: 2330-9.
- Cooke A. 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? *Immunology*. 126: 12-17.
- Elinluovuttajan hoito-ohje 2013. HYKS Kansalliset ohjeet elinluovuttajan hoidosta ja elinten talteenotosta. HUS, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti.
<http://www.hus.fi/ammattilaiselle/elinsiirtotoiminta/Documents/Elinluovuttajan%20hoito-ohje%2014.2.2013.doc>>. Luettu 30.3.2014
- Goldenberg R., Mikalachki A., ym. 2013. Clinical practice guidelines reducing the risk of developing diabetes. *Can J Diabetes* 37: S8-S11
- Harjutsalo V. - Sjöberg L.-Tuomilehto J. 2008. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet* 371: 1777–8.
- Han S. - Donelan W. - Wang H. ym. 2013: Novel autoantigens in type 1 diabetes. *Am J Transl Res*. 5(4): 379-392.
- Hyöty H. – Lehtinen M. - Roivainen M. 2000. Virusinfektioiden myöhäisvaikutukset. *Duodecim* 116: 79–87.

Hyöty H. - Virtanen S. M. 2004. Miksi tyypin 1 diabeteksen ilmaantuvuus on kasvanut Suomessa toisen maailmansodan jälkeen? Duodecim 120: 1147–55

Julkunen H.- Miettinen A. 2011a. Autoimmunitaudit ovat yleistyneet. Lääkärilehti 41: 3123-3327.

Julkunen H. - Miettinen A. 2011b. Autovasta-aineiden käytännön merkitys autoimmunitaudeissa. Lääkärilehti 42: 3115-3124.

Kelly WD. ym. 1967. Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. Surgery 61 (6): 827-37

Kikkas I.- Mallone R.- Tubiana-Rufi N.- Chevenne D.- Carel J.K.- Creminon C., Volland H.- Boitard C. - Morel N. 2013. A simple and fast non-radioactive bridging immunoassay for insulin autoantibodies. Plos one 8: S1-S7.

Kimpimäki T.- Kulmala P.- Savola K. ym. 2002. Natural history of beta-cell autoimmunity in young children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes recruited from the general population. J Clin Endocrinol Metab 87: 4572–9.

Kimpimäki T. - Kupila A. - Hämäläinen AM. ym. 2001. The first signs of β -cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: The Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. A Clin Endocrinol Metab 86: 4782–8.

Knip M. 2002. Natural course of preclinical type 1 diabetes. Horm Res Pediatr 57: 6-11.

Knip M. 2004. Onko tyypin 1 diabetes autoimmunisairaus ja voidaan sen kehittymistä estää? Duodecim 120: 1158 -1165.

Knip M. 2011. Pathogenesis of type 1 diabetes: implications for incidence trends. Horm Res Paediatr 76: 57-64.

Maniatis A.K. - Yu L. - Miao D. - Nelson K.- Eisenbarth G.S. ym. 2001. Rapid Assays for Detection of Anti-islet Autoantibodies: Implications for Organ Donor Screening. Journal of Autoimmunity 16/ s. 71-76.

Miettinen M.- Reinert L.- Kinnunen L.- Harjutsalo V.- Koskela P.- Surcel H.- M.-Lamberg - Allardt C. & Tuomilehto J. 2012. Serum 25-hydroxyvitamin D level during early pregnancy and type 1 diabetes risk in the offspring. Diabetologia 55 (5) 1291-1294.

Moss P .A. H.- Roseberg W M. - Bell J I. 1992. The human T cell receptor in health and disease. Ann Rev Immunol 10: 71–96.

Munger K. L. - Levin L. I. - Massa J. - Horst R.- Orban T. - Ascherio A. 2013. Preclinical serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of type 1 diabetes in a cohort of US military personnel. American Journal of Epidemiology Vol. 177 (5): 411-419.

Mustajoki P. 2012. Diabetes (sokeritauti). Lääkärikirja Duodecim,

Månsson L. - Tom C.- Landin-Olson M. 2001. Islet cell antibodies represent autoimmune response against several antigens. Int.J Exp. Diabetes. Res. 2: 85-90.

Rabin DU. - Pleasic SM.- Shapiro JA ym. 1994. Islet cell antigen 512 is a diabetes specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 152: 3183-8.

Reunanen A. 2006. Diabetes yleistyy Suomessa entistä kiivaammin, mutta diabeetikoiden ennuste paranee ja lisäsairauksien ilmaantuminen vähenee. *Diabetes ja lääkäri*; 35: 7–10.

Ronkainen E. 2003. Inkubaatioajan merkitys tyypin I diabeteksen autovasta-aineiden määrittämisessä. Opinnäytetyö. Helsingin ammattikorkeakoulu. Tekniikka ja liikenne-ala.

Rose NR.- Bona C.1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology Today*. 14: 426-30.

Salmela K. 2007. Haiman saarekesiirrot. *Diabetes ja lääkäri* 3. 36: 7-8.

Savola K. - Sabbah E. - Kulmala P. - Vähäsalo P. - Ilonen J. - Knip M.1998a. Autoantibodies associated with Type I diabetes mellitus persist after diagnosis in children. *Diabetologia* 41: 1293-1297.

Savola K.- Bonifacio E.-Sabbah E.- Kulmala P. - Vähäsalo P. - Karjalainen J. - Tuomi-lehto-Wolf E. - Meriläinen J.- Åkerblom H.K.-Knip M. 1998b. IA-2 antibodies - a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* 41: 424-429.

Seissler J.-Amann J.- Mauch L. ym. 1993. Prevalence of autoantibodies to the 65 and 67 kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 92: 1394-9.

Siljander H.- Knip M. 2011. Autovasta-aineet tyypin 1 diabeteksessä. *Lääkärilehti*. 49: 3745-3750.

Tiilikainen A.S.- Vaara M.- Vaheri A. 1998. Lääketieteellinen mikrobiologia. 8. uudistettu painos. Kustannus Oy Duodecim.

Toikkanen U. 2010. Elinsiirtoja koskeva lakimuutos voimaan. *Suomen Lääkärilehti*.

Tuomi T.- Groop LC.- Zimmet PZ ym. 1993. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a noninsulin- dependent onset of disease. *Diabetes* 42: 359-62.

Unanue - Alt - McDevitt. 2008. Immunopathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Advanced In Immunology*. vol. 100:57.

Uutispalvelu Duodecim. 2013. D-vitamiini saattaa ehkäistä nuoruustyypin diabetesta. Verkkodokumentti.

<[Uusi PEVNET-tutkimusohjelma tyypin 1 diabeteksen ehkäisemiseksi.2011. Suomen Diabetesliitto. Verkkodokumentti.](http://www.duodecim.fi/terveysportti/uutissorvi_uusi.lue_abstrakti2?id=16375&iprint=0&p_hakusana=>Luettu 3.05.2014.</p>
</div>
<div data-bbox=)

http://www.diabetesliitto.fi/diabetesliitto/ajankohtaista/ajankohtaista_arkisto/uusi_pevnet-tutkimusohjelma_tyypin_1_diabeteksen_ehkaisemiseksi.2558.news>Luettu 6.11.2014.

Veijola R. 2004. Tyypin 1 diabeteksen periytyvyydestä tiedetään melko paljon. Kansanterveyslehti 03: 4.-5.

Wenzlau JM1 - Juhl K. - Yu L. - Moua O. - Sarkar SA. - Gottlieb P. - Rewers M. - Eisenbarth GS. - Jensen J. - Davidson HW. - Hutton JC. 2007. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(43): 17040-5.

World Health Organisation 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, WHO s. 1-49.

Yu L.- Robles DT. ym. 2000. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: Evidence for early determination of subsequent diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 1701–1706.

Radioisotoopilla leimattujen proteiinien valmistus

Radioisotoopilla (L-[³⁵S]-Met (PerkinElmer Health Sciences B.V., Groningen, The Netherlands) leimattuja GAD65- ja IA-2 - proteiineja tuotetaan käyttäen Promega TNT® Quick Coupled transkriptio- ja translaatiokittiä (REF L2080 tai L1170, USA). (Pakkauksessa oleva) TNT- pakkauksessa ovat kaikki transkriptioon ja translaatioon tarvittavat komponentit, ³⁵S-metioniinin cDNA, joka transloidaan proteiiniksi ³⁵S-metioniinin läsnä ollessa. TNT- lyaatti sisältää kaikki muut aminohapot, paitsi metioniinin. Inkubaatio 30 °C 90 minuuttia.

³⁵S-metioniini-leimattu proteiini erotetaan vapaasta leimasta NAP-5-pylväillä (GE Healthcare UK Limited, UK). Pylväät pestään kaksi kertaa TBST + 0.1 % BSA - puskurilla, reaktioseos pipetoidaan pylväisiin ja annetaan imeytyä. Leimattu proteiini eluoidaan TBST / 0.1 % BSA- puskurilla. Yhdestä pylvästä kerätään leimaa kuuteen putkeen (3 tippaa/putki, mikä vastaa 100 µl). Fraktioiden radioaktiivisuus mitataan nestetuikelaskurilla (Microbeta Trilux, 1450, Perkin Elmer) ja yli 20 000 cpm/ul sisältävät fraktiot yhdistetään. Leima jaetaan sopiviin eriin ja pakastetaan -80 °C odottamaan käyttöä.

Pipetointikaavio GADA, IA-2A ja ZnT8A määrittelykselle RBA:lla

Pika GADA pipetointikaavio

1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
LOW	LOW	MED	MED	NHS	NHS	1:32768	1:32768	1:16384	1:16384	1:8192	1:8192
1:4096	1:4096	1:2048	1:2048	1:1024	1:1024	1:512	1:512	1:256	1:256	1:128	1:128

Pika IA2-A pipetointikaavio

1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
LOW	LOW	HIGH	HIGH	NHS	NHS	1:2048	1:2048	1:1024	1:1024	1:512	1:512
1:256	1:256	1:128	1:128	1:64	1:64	1:32	1:32	1:16	1:16	1:4	1:4

Pika ZnT8A pipetointikaavio

1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
LOW	LOW	MED	MED	NHS	NHS	1:1024	1:1024	1:512	1:512	1:256	1:256
1:128	1:128	1:64	1:64	1:132	1:32	1:16	1:16	1:4	1:4	1:2	1:2

Pipetointikaavio kaikki kolme määrittystä yhtäaikaaisesti RSR ELISA kiteillä

INKUBAATIO HUONEENLÄMMÖSSÄ 20 min KAKKI 3 MÄÄRITYSTÄ YHTÄAIKAA

ELISA -menetelmä											
			GAD6 Lotti:								
			IA2A Lotti:								
			ZnT6 Lotti:								
			Pvm:								
Määrä	GAD6A	IA2A	ZnT6A								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	BL	BL	BL								
B	St 5	St 7.5	St 10								
C	St 18	St 35	St 20								
D	St 35	St 120	St 75								
E	St 120	St 350	St 500								
F	St 250	St 400	St 2000								
G	Kon -	Kon -	Kon -								
H	Kon +	Kon +	Kon +								

Multiskanin Ascent Software-ohjelma:

Laskuohjelma: **GADY450**

Laskuohjelma: **IA2Y450**

Laskuohjelma: **ZNT8Y450**

Ohjelman asetukset:

- Fit type: Cubic spline.
- Transformation:
 - ✓ Mean transformation: Linear
 - ✓ Conc. transformation: Log 10

1. INKUBAATIO klo: Inkubaatio huoneenlämmössä 20'

1. Pesu

BIOTIN

2. INKUBAATIO klo: Inkubaatio huoneenlämmössä 20'

2. Pesu

SA - POD

3. INKUBAATIO klo: Inkubaatio huoneenlämmössä 20'

3. Pesu

TMB

4. INKUBAATIO klo: Inkubaatio huoneenlämmössä 20'

PIMEÄSSÄ. Ei ravitusta!

STOP

ELISA:n absorbanssit: kaikki 3 määrittystä yhdessä

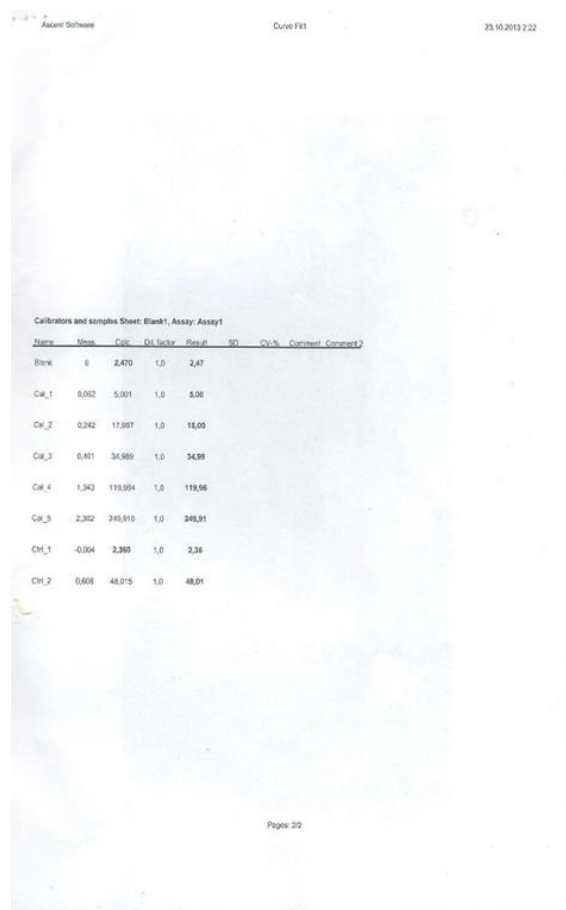
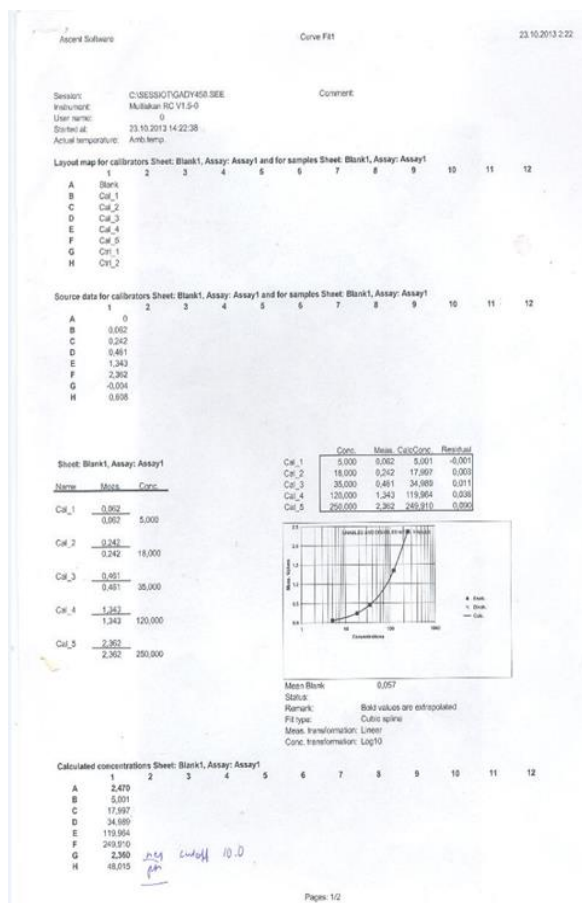
Kaikki 3määrittystä yhdessä

Huoneen inkubaatio 20min. #GADY1

Measurement count: 1 Filter: 450

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.054	0.075	0.058	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0.119	0.088	0.070	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0.303	0.131	0.100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0.523	0.388	0.258	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	1.412	1.608	1.891	0	0.001	0	0	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
F	2.472	3.563	4.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0.053	0.093	0.051	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0.673	0.306	0.160	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	gad	IA2	ZNT									

ELISA:n GADA tulokset (kaikki 3 määrittystä yhdessä)



Yhteenveto GADA:n tuloksista (n=6) RBA:lla

GAD- autovasta-aineet standardi RBA menetelmällä							
näyte	ka	median	min	max	stdev	posit	posit %
D1	10,84	9,11	7,00	20,53	4,19	9/9	100,0
D2	8,86	8,89	0,07	17,46	4,68	8/9	88,9
D3	16,74	17,26	13,87	17,94	1,43	9/9	100,0
D4	5,59	4,66	3,27	9,97	2,55	3/9	33,3
D5	14,50	14,01	13,41	15,78	1,00	9/9	100,0
D6	1,86	1,71	0,34	4,36	1,29	0/9	0,0
GAD- autovasta-aineet n. 3 h RBA pikamenetelmällä							
näyte	ka	median	min	max	std	posit	posit%
D1	8,51	9,14	5,30	10,12	1,79	8/9	88,9 %
D2	4,46	5,18	0,33	6,60	2,00	4/9	44,4 %
D3	14,73	13,97	10,65	21,06	3,73	9/9	100,0 %
D4	8,35	7,69	5,77	11,77	1,85	9/9	100,0 %
D5	10,65	10,11	7,51	16,00	2,77	9/9	100,0 %
D6	4,32	4,28	0,00	7,66	2,32	3/9	33,3 %
GAD- autovasta-aineet n. 2 h RBA pikamenetelmällä							
näyte	ka	median	min	max	stdev	posit	posit%
D1	7,02	8,36	0,00	9,79	3,7	5/7	71,4
D2	5,98	6,66	0,00	9,07	3,0	5/7	71,4
D3	15,97	15,95	7,13	19,26	2,3	7/7	100,0
D4	9,16	9,39	4,35	11,10	1,6	7/7	100,0
D5	10,60	10,96	2,54	17,52	4,0	6/7	85,7
D6	5,33	5,25	2,54	8,36	2,3	3/7	42,8

Yhteenveto IA-2A:n tuloksista (n=6) RBA:lla

IA-2- autovasta-aineet standardi RBA menetelmällä							
näyte	ka	median	min	max	stdev	pos	posit %
D7	6,10	5,980	3,610	8,809	1,648	9/9	100,0
D8	0,64	0,630	0,388	1,185	0,250	2/9	22,2
D9	1,37	1,408	0,127	2,634	0,778	6/8	75,0
D10	2,80	2,584	1,677	4,750	1,026	9/9	100,0
PJ1	0,10	0,112	0,056	0,133	0,030	0/9	0,0
PJ2	1,08	1,153	0,179	1,646	0,470	7/8	87,5
IA-2- autovasta-aineet n. 3 h RBA pikamenetelmällä							
näyte	ka	median	min	max	stdev	pos	posit %
D7	7,21	6,753	2,668	12,695	2,882	12/12	100,0
D8	1,18	1,140	0,438	14,924	0,659	10/12	83,3
D9	3,52	2,279	0,757	14,924	3,817	11/12	91,6
D10	1,17	1,319	0,227	3,068	0,581	10/12	83,3
PJ1	0,46	0,207	0,089	3,068	0,795	1/12	8,3
PJ2	1,18	1,252	0,560	2,291	0,455	10/12	83,3
IA-2- autovasta-aineet n. 2 h RBA pikamenetelmällä							
näyte	ka	median	min	max	stdev	pos	posit%
D7	6,31	5,911	3,173	11,925	3,361	5/5	100,0
D8	0,96	0,933	0,602	1,410	0,311	3/5	60,0
D9	0,77	0,726	0,345	1,236	0,342	2/5	40,0
D10	1,72	1,694	1,427	2,151	0,276	5/5	100,0
PJ1	0,32	0,307	0,151	0,456	0,137	0/5	0,0
PJ2	1,44	1,314	0,554	2,516	0,751	3/5	60,0

Yhteenveto ZnT8A:n tuloksista (n=6) RBA:lla

ZnT8- autovasta-aineet standardi RBA menetelmällä							
näyte	ka	median	min	max	stdev	pos	pos%
D11	45,87	47,980	37,389	51,205	4,792	7/7	100,0
D12	0,86	0,869	0,790	0,966	0,064	7/7	100,0
D13	0,51	0,505	0,427	0,555	0,042	0/7	0,0
D14	0,07	0,066	0,060	0,078	0,007	0/7	0,0
D15	2,47	2,529	2,066	2,819	0,282	7/7	100,0
D16	0,55	0,559	0,443	0,674	0,075	1/7	14,2
ZnT8- autovasta-aineet n. 2 h RBA pikamenetelmällä							
näyte	ka	media	min	max	stdev	pos/kaikki	pos%
D11	51,07	32,239	10,426	129,388	53,817	4/4	100
D12	0,76	0,545	0,439	1,528	0,512	1/4	25
D13	0,42	0,384	0,271	0,635	0,172	1/4	25
D14	0,07	0,064	0,051	0,113	0,028	0/4	0
D15	4,49	3,872	2,978	7,246	1,885	4/4	100
D16	0,64	0,607	0,324	1,014	0,285	2/4	50

Yhteenveto GADA:n tuloksista (n=37) ELISA:lla

ELISA GADA cut-off 10u/ml					
GADA 65 koodatu 37kpl			CV %		
	huonel. 20'		huonel. 20'	huonel. 20'	
	30.10.2013		30.10.2013	14.11.2013	
	2 rinnakaisena	1. rinnak.	2. rinnak.	uusinnat	
low	30.13	30.13	30.13	0	21.33
medium	179.6	181.14	178.05	1.22	177.41
KONneg. K	2.84	2.89	2.79	2.46	2.6
KONpos.kit	50.58	51.3	49.87	2	55.54
1	15.92	17.46	14.38	13.69	
2	23.03	23.83	22.23	4.91	24.26
3	97.75	98.96	96.54	1.74	
4	22.85	23.02	22.69	1.03	
5	2.86	2.97	2.75	5.52	
6	2.79	2.82	2.77	1.23	
7	2.84	2.84	2.84	0	
8	3.06	3.1	3.02	1.84	
9	2.82	2.89	2.75	3.68	
10	2.78	2.77	2.79	0.61	
11	36.44	37.27	35.61	3.23	
12	155.83	156.05	155.6	0.2	
13	3.17	3.16	3.18	0.61	
14	219.16	223.95	214.37	3.09	
15	67.11	67.94	66.29	1.74	
16	126.09	125.41	126.76	0.76	
17	2.89	2.87	2.92	1.23	2.6
38	2.82	2.84	2.79	1.23	
39	2.84	2.82	2.87	1.23	
40	2.98	3.02	2.94	1.84	
41	2.79	2.77	2.82	1.23	
42	2.82	2.82	2.82	0	
43	2.81	2.79	2.82	0.61	
44	2.87	2.94	2.79	3.68	
45	2.79	2.84	2.75	2.46	
46	2.86	2.79	2.92	3.07	
47	2.97	2.94	3	1.23	
51	81.21	81.63	80.8	0.72	
52	118.2	126.13	110.27	9.49	
53	17.59	18.22	16.95	5.09	
54	7.85	8.02	7.67	3.12	6.97
55	9.05	9.32	8.78	4.2	
56	67.1	68.39	65.81	2.72	
57	2.81	2.82	2.79	0.61	
58	2.91	2.87	2.94	1.84	
59	2.89	2.97	2.82	3.68	
60	2.92	3	2.84	3.68	

	koodatut 37kpl			CV %
	Kitin ohje			Kitin ohje
	7.11.2013			7.11.2013
	2 rinnakaisena	1. rinnak.	2. rinnak.	
low	25.59	26.12	25.06	2.93
medium	167.31	174.14	160.48	5.77
KONneg. Kitin	2.59	2.51	2.66	4.07
KONpos.kitin	51.25	50.38	52.11	2.38
1	22.75	22.8	22.7	0.3
2	25.71	26.12	25.3	2.26
3	87.67	91.68	83.56	6.55
4	32.67	33.43	31.84	3.44
5	2.68	2.56	2.54	0.41
6	2.68	2.69	2.66	0.81
7	2.6	2.54	2.65	2.85
8	2.59	2.6	2.57	0.81
9	2.92	2.84	3.01	4.07
10	2.65	2.66	2.63	0.81
11	44.75	46.7	42.8	6.16
12	144.29	151.32	137.26	6.89
13	3.03	3.01	3.06	1.22
14	303.17	284.84	321.51	8.55
15	76.31	79.11	73.51	5.19
16	127.18	128.78	125.59	1.77
17	2.63	2.6	2.65	1.22
38	2.63	2.62	2.65	0.81
39	2.51	2.5	2.51	0.41
40	2.55	2.59	2.51	2.03
41	2.52	2.5	2.54	1.22
42	2.65	2.66	2.63	0.81
43	2.57	2.62	2.53	2.44
44	2.51	2.5	2.53	0.81
45	2.67	2.68	2.66	0.41
46	2.6	2.6	2.59	0.41
47	2.51	2.5	2.53	0.81
51	76.12	75.94	76.31	0.34
52	124.64	129.15	120.13	5.12
53	21.27	20.09	22.45	7.84
54	*10.13	10.02	10.24	1.53
55	7.76	8.07	7.44	5.77
56	76.81	78.73	74.9	3.53
57	2.51	2.51	2.51	0
58	2.48	2.49	2.47	0.29
59	2.49	2.49	2.49	0
60	2.51	2.5	2.53	0.81

GADA:n lineaarinen regressioanalyysi (n=37)

Correlations

		EGADkit	EGADpika
EGADkit	Pearson Correlation	1	,980**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
EGADpika	Pearson Correlation	,980**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

		EGADkit	RGadast
EGADkit	Pearson Correlation	1	,941**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RGadast	Pearson Correlation	,941**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

		EGADkit	RGAD2h
EGADkit	Pearson Correlation	1	,905**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RGAD2h	Pearson Correlation	,905**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

		EGADpika	RGadast
EGADpika	Pearson Correlation	1	,934**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RGadast	Pearson Correlation	,934**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

		EGADpika	RGAD2h
EGADpika	Pearson Correlation	1	,934**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RGAD2h	Pearson Correlation	,934**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

		RGadast	RGAD2h
RGadast	Pearson Correlation	1	,941**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RGAD2h	Pearson Correlation	,941**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

IA-2A:n lineaarinen regressioanalyysi (n=37).

Correlations			
		EIA2kit	EIA2pika
EIA2kit	Pearson Correlation	1	,956**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
EIA2pika	Pearson Correlation	,956**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		EIA2kit	RIA2st
EIA2kit	Pearson Correlation	1	,791**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RIA2st	Pearson Correlation	,791**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		EIA2kit	RIA22h
EIA2kit	Pearson Correlation	1	,938**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RIA22h	Pearson Correlation	,938**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		EIA2pika	RIA2st
EIA2pika	Pearson Correlation	1	,707**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RIA2st	Pearson Correlation	,707**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		EIA2pika	RIA22h
EIA2pika	Pearson Correlation	1	,861**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RIA22h	Pearson Correlation	,861**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		RIA2st	RIA22h
RIA2st	Pearson Correlation	1	,912**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RIA22h	Pearson Correlation	,912**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

ZnT8A lineaarinen regressioanalyysi (n=37)

Correlations			
		EZnT8kit	EZnT8pika
EZnT8kit	Pearson Correlation	1	,866**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
EZnT8pika	Pearson Correlation	,866**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		EZnT8kit	RZnT8st
EZnT8kit	Pearson Correlation	1	,754**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RZnT8st	Pearson Correlation	,754**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		EZnT8kit	RZnT82h
EZnT8kit	Pearson Correlation	1	,868**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RZnT82h	Pearson Correlation	,868**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		EZnT8pika	RZnT8st
EZnT8pika	Pearson Correlation	1	,827**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RZnT8st	Pearson Correlation	,827**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		EZnT8pika	RZnT82h
EZnT8pika	Pearson Correlation	1	,741**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RZnT82h	Pearson Correlation	,741**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations			
		RZnT8st	RZnT82h
RZnT8st	Pearson Correlation	1	,862**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	37	37
RZnT82h	Pearson Correlation	,862**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	37	37

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).